

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

“ΛΟΙΜΩΞΙΟΛΟΓΙΑ”

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Ε. Ι. ΓΙΑΜΑΡΕΛΛΟΣ-ΜΠΟΥΡΜΠΟΥΛΗΣ

ΧΡΙΣΤΙΝΑ Δ. ΔΑΜΟΥΛΑΡΗ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΤΟ ΥΔΡΟΘΕΙΟ ΣΤΗΝ ΠΡΟΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ COVID-19

ΑΘΗΝΑ 2021

**ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

**ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ** ..... 7

- Ο ρόλος του υδροθείου στη φλεγμονή ..... 9
- Ο ρόλος του υδροθείου στις λοιμώξεις αναπνευστικού ..... 12

**ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ** ..... 18

- Υλικά και μέθοδοι ..... 22
- Στατιστική ανάλυση ..... 23

**ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**..... 37

**Βιογραφικό σημείωμα  
(CV)**

**Προσωπικές  
πληροφορίες**

Επώνυμο (-α) / Όνομα (-  
τα)

**ΔΑΜΟΥΛΑΡΗ ΧΡΙΣΤΙΝΑ**

Ιδιότητα/τίτλος

**ΙΑΤΡΟΣ-ΕΙΔΙΚΕΥΟΜΕΝΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ, ΥΠΟΨΗΦΙΑ ΔΙΔΑΚΤΩΡ  
ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ Ε.Κ.Π.Α.**

Διεύθυνση (-εις)

**ΕΛΑΙΩΝ 5  
121-37 ΠΕΡΙΣΤΕΡΙ-ΑΤΤΙΚΗΣ (ΕΛΛΑΔΑ)**

Κινητό

**694 7307011**

Διεύθυνση (-εις)  
ηλεκτρονικού  
ταχυδρομείου

**damoulari\_christina@hotmail.com**

Υπηκοότητα

**ΕΛΛΗΝΙΚΗ**

|                                    |   |
|------------------------------------|---|
| Ημερομηνία γέννησης                | <b>30/10/1990</b>   |
| Φύλο                               | <b>Θήλυ</b>   |
| θέση εργασίας / τομέας απασχόλησης | <b>ΕΙΔΙΚΕΥΟΜΕΝΗ ΙΑΤΡΟΣ Δ' ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΠΓΝ ΑΤΤΙΚΟΝ</b>  |
| Εκπαίδευση και κατάρτιση           | <p><b>01/2017-06/2021 ΑΣΚΗΣΗ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑΣ ΕΣΩΤΕΡΙΚΗΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ</b></p> <p><b>10/2019-06/2021 ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΕΚΠΑ- "ΛΟΙΜΩΞΙΟΛΟΓΙΑ"</b></p> <p><b>04/2021 ΥΠΟΨΗΦΙΑ ΔΙΔΑΚΤΩΡ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ στη Γ' ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ</b></p> <p><b>(Αρ.Πρωτ Έγκρισης 3 μελους : 73086431882/21-5-2021 ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΕΚΠΑ)</b><br/> <b>Τριμελής επιτροπή 1.Καθηγητής κ. ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ ΠΙΚΟΥΛΗΣ (επιβλέπων)</b></p> <p style="padding-left: 100px;"><b>2.Καθηγητής κ. ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ ΓΙΑΜΑΡΕΛΛΟΣ-ΜΠΟΥΡΜΠΟΥΛΗΣ</b></p> <p style="padding-left: 100px;"><b>3.Καθηγήτρια κ. ΕΡΙΦΥΛΗ ΧΑΤΖΗΑΓΓΕΛΑΚΗ</b></p> <p><b>-10/2015- 10/2016 Άσκηση υπηρεσίας υπαίθρου</b></p> <p><b>-2014 -σήμερα Συμμετοχή σε ερευνητικά προγράμματα και κλινικές μελέτες ως ερευνήτρια</b></p> <p><b>-2009-2015 Φοίτηση στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Πατρών</b></p> |
| Ατομικές δεξιότητες και ικανότητες |   |

Μητρική (-ες) γλώσσα (-ες) **ΕΛΛΗΝΙΚΑ**

Άλλη (-ες) γλώσσα (-ες)

Αυτοαξιολόγηση

Ευρωπαϊκό επίπεδο (\*)

**Αγγλικά**

**Γαλλικά**

**Γερμανικά**

| Κατανόηση |                  |                   |                  | Ομιλία      |                  |                   |                  | Γραφή  |                  |
|-----------|------------------|-------------------|------------------|-------------|------------------|-------------------|------------------|--------|------------------|
| Προφορική |                  | Γραπτή (ανάγνωση) |                  | Επικοινωνία |                  | Προφορική έκφραση |                  |        |                  |
| B<br>2    | Επαρκής γνώση    | B<br>2            | Επαρκής γνώση    | B<br>2      | Επαρκής γνώση    | B<br>2            | Επαρκής γνώση    | B<br>2 | Επαρκής γνώση    |
| C<br>1    | Έμπειρος χρήστης | C<br>1            | Έμπειρος χρήστης | C<br>1      | Έμπειρος χρήστης | C<br>1            | Έμπειρος χρήστης | C<br>1 | Έμπειρος χρήστης |
| B<br>2    | Επαρκής γνώση    | B<br>2            | Επαρκής γνώση    | B<br>2      | Επαρκής γνώση    | B<br>2            | Επαρκής γνώση    | B<br>2 | Επαρκής γνώση    |

(\*) [βαθμίδες του κοινού ευρωπαϊκού πλαισίου αναφοράς](#)

Δεξιότητες πληροφορικής

**-ΑΡΙΣΤΗ ΧΡΗΣΗ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ**

**-Άριστη γνώση Office-world/excel/power point**

**-Μουσικά όργανα: άριστη γνώση πιάνο**

Άδεια οδήγησης

B

Πρόσθετες πληροφορίες

- Μέλος της Ελληνικής Ομάδας Μελέτης της Σήψης
- Παρακολούθηση επιστημονικών συνεδρίων, ημερίδων

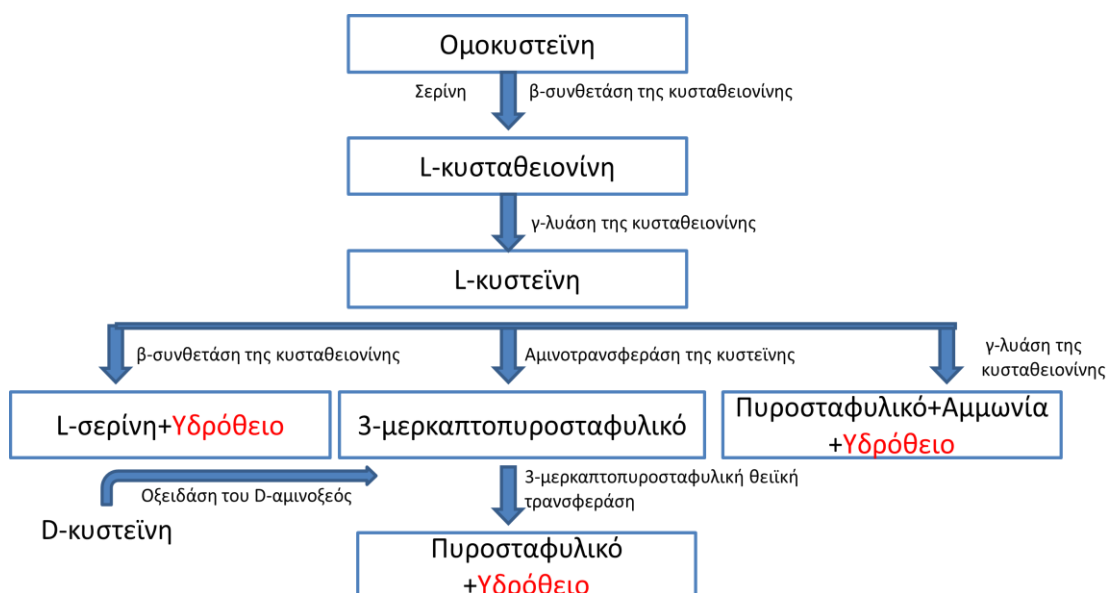
1. [Serum Hydrogen Sulfide and Outcome Association in Pneumonia by the SARS-CoV-2 Coronavirus.](#)  
Renieris G, Katrini K, **Damoulari C**, Akinosoglou K, Psarrakis C, Kyriakopoulou M, Dimopoulos G, Lada M, Koufargyris P, Giamarellos-Bourboulis EJ. Shock. 2020 Nov;54(5):633-637.  
doi:10.1097/SHK.0000000000001562.PMID: 32433216
  
2. [A cost of illness analysis of hepatocellular carcinoma for the Greek healthcare setting.](#)  
Athanasakis K, Pliarchopoulou F, Naoum V, Psarrakis C, Tziolos N, Marantos T, **Damoulari C**, Chounta A. Gastroenterol Hepatol Bed Bench. 2020 Summer;13(3):219-222.PMID: 32821351
  
3. [Callo: The first known case of ambiguous genitalia to be surgically repaired in the history of Medicine, described by Diodorus Siculus.](#)  
Markantes GK, Deligeoroglou E, Armeni AK, Vasileiou V, **Damoulari C**, Mandrapilia A, Kosmopoulou F, Keramisanou V, Georgakopoulou D, Creatsas G, Georgopoulos NA. Hormones (Athens). 2015 Jul-Sep;14(3):459-61.  
doi:10.14310/horm.2002.1608.PMID: 26188239
  
4. [Gender identity disputed in the court of justice: a story of female to male sexual transformation in the hellenistic period, described by Diodorus Siculus.](#)  
Armeni AK, Vasileiou V, Markantes G, **Damoulari C**, Mandrapilia A, Kosmopoulou FA, Keramisanou V, Georgakopoulou D, Georgopoulos NA.  
Hormones (Athens). 2014 Oct-Dec;13(4):579-82. doi: 10.14310/horm.2002.1504. Epub 2014 Nov 5.PMID: 25402392

## ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Το υδρόθειο ( $H_2S$ ) απαντάται σε μορφή αερίου και προέρχεται από τη βιοσύνθεση της L-κυστεΐνης, η οποία εξαρτάται από την ενεργότητα των εξής τριών ενζύμων: τη  $\gamma$ -λυάση της κυσταθειονίνης (CSE), τη  $\beta$ -συνθετάση της κυσταθειονίνης (CBS) καθώς και τη 3-μερκαπτοπυροσταφυλική θειϊκή τρανσφεράση (3-MST) (1).

Το μονοπάτι που ακολουθείται άρχεται από την ομοκυστεΐνη η οποία μέσω της δράσης της  $\beta$ -συνθετάσης της κυσταθειονίνης (CBS) μετατρέπεται σε L-κυσταθειονίνη, κι έπειτα μέσω της δράσης της  $\gamma$ -λυάσης της κυσταθειονίνης (CSE) υδρολύεται σε L-κυστεΐνη.

Με περισσότερες από μία ενζυμικές οδούς οδηγεί η L-κυστεΐνη στην παραγωγή υδροθείου. Όπως παρουσιάζεται και στο παρακάτω σχήμα, μέσω της  $\beta$ -συνθετάσης της κυσταθειονίνης (CBS) απελευθερώνεται υδρόθειο και L-σερίνη, ενώ διαμέσου της δράσης της  $\gamma$ -λυάσης της κυσταθειονίνης (CSE) απελευθερώνεται υδρόθειο, αμμωνία και πυροσταφυλικό. Η 3-μερκαπτοπυροσταφυλική θειϊκή τρανσφεράση (3-MST) συμμετέχει σε διαφορετικό μονοπάτι, διαδεχόμενη τη μετατροπή της L-κυστεΐνης σε 3-μερκαπτοπυροσταφυλικό, δρα επάνω στην τελευταία με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή πυροσταφυλικού και υδροθείου (2).



Η  $\beta$ -συνθετάση της κυσταθειονίνης (CBS) εκφράζεται κυρίως στον εγκέφαλο και τους νεφρούς, ενώ η  $\gamma$ -λυάση της κυσταθειονίνης (CSE) στο ήπαρ. Μεταξύ των πολλαπλών ρόλων του υδροθείου στην παθοφυσιολογία, σημαντικός είναι ο ρόλος του ως διαμεσολαβητής προφλεγμονωδών διεργασιών

(3). Μεταβολές στο σηματοδοτικό μονοπάτι υδροθείου/γ-λυάση της κυσταθειονίνης(CSE) συσχετίζονται με διάφορες φλεγμονώδεις διεργασίες (3).

Ως προς το μεταβολισμό του υδροθείου, αξιοσημείωτο είναι ότι αποτελεί το μοναδικό γνωστό ανόργανο υπόστρωμα το οποίο οξειδώνεται μέσω ενζυμικής μεθόδου στα μιτοχόνδρια, αποτελώντας απόδειξη για την προέλευση των μιτοχονδρίων από βακτήρια στα οποία λάμβανει χώρα αντίδραση οξειδωσης θειούχων. Το υδρόθειο οξειδώνεται από σουλφίδια: η οξειδοορεδοκτάση της κινόνης (SQR) μεταφέρει ηλεκτρόνια στην ουμπικινόνη (συνένζυμο Q) από την οποία στη συνέχεια μεταφέρονται στο κυτόχρωμα c διαμέσου της ουμπικινόλης, της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (συμπλεγμα III) και τελικά δημιουργία μοριακού οξυγόνου μέσω της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (σύμπλεγμα IV). Η οξειδοορεδοκτάση της κινόνης αντιπροσωπεύει τη τρίτη κατά σειρά πηγή ηλεκτρονίων που χρησιμοποιούνται στη μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα, σε συνδυασμό με τη δεϋδρογονάση NADH (σύμπλεγμα I) και την ηλεκτρική δεϋδρογονάση (σύμπλεγμα II) εμπλέκονται στην οξειδωση των ανόργανων υποστρωμάτων(4). Αξίζει να σημειωθεί ότι το υδρόθειο οξειδώνεται στα μιτοχόνδρια μόνο όταν το ίδιο βρίσκεται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις, της τάξης έως 5μM. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αναστέλλεται το κυτόχρωμα c και κατ'επέκταση ακολουθεί καταβολισμός και ανεπάρκεια ATP. Ο ρυθμός της μιτοχονδριακής οξειδωσης του υδροθείου φαίνεται να καθορίζεται από τα επίπεδα οξυγόνου. Σε συνθήκες ανεπάρκειας οξυγόνου, ο μεταβολισμός του ανόργανου στοιχείου είναι μειωμένος. Υπό αυτές τις συνθήκες όταν το υδρόθειο ανευρίσκεται σε περίσσεια στους ιστούς κατέχει ρόλο αισθητήρα οξυγόνου για περισσότερους των ενός ιστούς μεταξύ των οποίων και τα αγγειακό δίκτυο (4).

Ως προς τη σηματοδότηση, το υδρόθειο αλληλεπιδρά με τρία είδη μοριακών στόχων, πρωτεϊνικές ή μικρομοριακές ομάδες θειολών, ενεργά είδη οξυγόνου ή νιπρωδών, και μεταλλοπρωτεΐνάσες. Το υδρόθειο αλληλεπιδρά με -SH ομάδες μετατρέποντάς τις σε -SSH ομάδες. Παραδείγματα τροποποιημένων πρωτεϊνών αποτελούν οι ATP-εξαρτώμενοι διάυλοι καλίου(  $K_{ATP}$ ), χαμηλής και ενδιάμεσου αγωγιμότητας ασβέστιο-εξαρτώμενοι διάυλοι καλίου ( $SK_{Ca}$ ,  $IK_{Ca}$  channels), οι τασεο-ευαίσθητοι διάυλοι καλίου ( $K_{v4.3}$ ), VEGFR1(vascular endothelial growth factor receptor 1), λιγκάση της ουμπικουϊνής 3, υπομονάδα p65 του NF-kB, Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1), eNOS(endothelial NO synthetase), πρωτεϊνική κινάση G( PKG), MAPK/ERK κινάση(NEK1), IRF1(transcriptional repressor interferon regulatory factor 1). Προαπαιτούμενο για να καταλυθούν αντιδράσεις προσθήκης θειϊκών ομάδων στις πρωτεΐνες από το υδρόθειο αποτελεί η οξειδωση των θειούχων ομάδων σε δισουλφίδια ή σε σουλφιδικό οξύ (-SOH) ή η οξειδωση του ίδιου του μορίου του υδροθείου σε ανόργανα πολυσουλφίδια ( $H_2S_n$ ). Το υδρόθειο αλληλεπιδρά με ενεργά μόρια οξυγόνου, όπως  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $ONOO^-$ , HOCl, με αποτέλεσμα την μειωμένη συγκέντρωση αυτών. Τέλος, το υδρόθειο αλληλεπιδρώντας με αιμο-πρωτεΐνες όπως η οξειδάση του κυτοχρώματος c, η αιμοσφαιρίνη, η μυοσφαιρίνη και η μυελοπεροξειδάση



καθώς και αναστέλλοντας μερικώς τη μιτοχονδριακή αναπνοή είναι δυνατό να ασκεί προστατευτική δράση σε συνθήκες υποξίας (4).

### Ο ρόλος του υδροθείου στην φλεγμονή

Τα δεδομένα των μελετών ως προς τη δράση του υδροθείου στις φλεγμονώδεις διεργασίες είναι αμφιλεγόμενα δεδομένου ότι έχουν παρατηρηθεί και καταγραφεί πολλαπλές τόσο προφλεγμονώδεις όσο και αντιφλεγμονώδεις δράσεις αυτού (5).

Φαίνεται ότι η αυξημένη εξωγενής προσθήκη (με δότες υδροθείου όπως ο GYY4137 αλλά και ο STS) αλλά και η ενδογενής (μέσω της γ-λυτάσης της κυσταθειονίνης –CSE) παραγωγή υδροθείου τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* σε πειραματικά μοντέλα, παρέχει τη δυνατότητα διαχείρισης φλεγμονωδών διεργασιών όπως η περιτονίτιδα μέσω της αναστολής του φλεγμονοσώματος NLRP3 (5). Παρατηρήθηκαν περισσότεροι του ενός μηχανισμοί αναστολής λειτουργίας του NLRP3 κατά την πειραματική διαδικασία, με αποτέλεσμα την αναστολή της μετατροπής της προ-ιντερλευκίνης 1β σε ενεργό ιντερλευκίνη 1β (5).

Ενδεικτικά αναφέρεται ότι η εξωγενής χορήγηση του υδροθείου μέσω δοτών αυτού οδηγεί στην αναστολή της ενεργοποίησης του φλεγμονοσώματος NLRP3 σε μακροφάγα διεγερμένα από αγωνιστές του φλεγμονοσώματος, όπως το ουρικό μονονάτριο ή η νιγκερισίνη, στην αναστολή της ενεργοποίησης της οξειδάσης της ξανθίνης και της απελευθέρωσης ελεύθερων ριζών οξυγόνου (5).

Στα πλαίσια της μελέτης των Dun-quan XU et al. διερευνήθηκαν τα προστατευτικά φαινόμενα του υδροθείου έναντι της φλεγμονής, του οξειδωτικού στρες και της κυτταρικής απόπτωσης, σε πειραματικά μοντέλα αρουραίων. Κατά την διεξαγωγή της μελέτης δημιουργήθηκε αιμορραγική καταπληξία στα πειραματόζωα για 90 λεπτά. Ακολούθησε αναζωογόνηση και παρακολούθηση αυτών για 200 λεπτά. Εν συνεχεία θυσιάστηκαν και συλλέχθηκαν τόσο οι πνεύμονες όσο και βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα. Προ της διάσωσης χορηγήθηκε NaHS (28 μmol/kg). Η αιμορραγική καταπληξία παρακίνησε φλεγμονώδη απάντηση στο πνευμονικό παρέγχυμα και σημαντική αύξηση των φλεγμονωδών κυτταροκινών-IL-6, TNFα, HMGB1 στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (6). Επιπλέον, προκλήθηκε έντονο οξειδωτικό στρες στον πνευμονικό ιστό δεδομένης της σημαντικής αύξησης στην παραγωγή ενεργοποιημένων ριζών του οξυγόνου- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και OH<sup>-</sup>, της μετατόπισης στον κυτταρικό πυρήνα του Nrf2, ενός σημαντικού ρυθμιστή της αντιοξειδωτικής έκφρασης, και της μείωσης της έκφρασης της θειορεδοξίνης 1. Επιπρόσθετα, μετά την ανάνηψη από την αιμορραγική καταπληξία παρατηρήθηκε αύξηση στην έκφραση του υποδοχέα Fas, έως εξαπλάσιες τιμές, καθώς και του Fas-L, έως πενταπλάσιες τιμές, τετραπλασιασμός στον αριθμό των αποπτωτικών κυτάρων στον πνευμονικό ιστό, διπλασιασμός των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών FADD (Fas-associated protein with death

domain), 150% αύξηση της ενεργού κασπάσης-3, 33,3% αύξηση της ενεργού κασπάσης-8, 10% αύξηση της πρωτεΐνης Bax (Bcl-2-associated X protein) καθώς και μείωση 2,5% της έκφρασης του Bcl-2. Η αποπτωτική διαδικασία συμμετέχει στην οξεία πνευμονική βλάβη, επιπλέον τις αλληλεπιδράσεις Fas/Fas-L (6).

Η έγχυση NaHS εξασθένησε σημαντικά τις περιγραφείσες παθοφυσιολογικές απαντήσεις μειώνοντας κατά μέσο όρο τουλάχιστον κατά 20% τις προαναφερόμενες αυξημένες συγκεντρώσεις.

Ως προς τη διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας, οι αρουραίοι κατατάχθηκαν σε τέσσερις ομάδες. Στην πρώτη ομάδα (Sham operated)-κατατάχθηκε η εικονική χειρουργική παρέμβαση, στη δεύτερη ομάδα επιπρόσθετα της εικονικής χειρουργικής παρέμβασης χορηγήθηκε NaHS. Στην Τρίτη ομάδα τα ζώα υποβλήθηκαν σε αιμορραγική καταπληξία, ενώ στην τέταρτη επιπρόσθετα της αιμορραγικής καταπληξίας ,χορηγήθηκε NaHS (6).

Η δραστηριότητα της μυελοπεροξειδάσης στον πνευμονικό ιστό αυξήθηκε σημαντικά, κατά 60 %, στην ομάδα της αιμορραγικής καταπληξίας, σε σύγκριση με την ομάδα της εικονικής χειρουργικής παρέμβασης (Sham operated, Sham+ NaHS). Ενώ όταν χορηγήθηκε NaHS στα πειραματόζωα αυτή μειώθηκε κατά 40% (6).

Συνολικά, αποδείχτηκε ότι η προσθήκη NaHS ασκεί προστατευτική δράση έναντι της φλεγμονώδους απάντησης σε πειραματικά μοντέλα καταστέλλοντας το οξειδωτικό στρες καθώς και το Fas/FasL αποπτωτικό σηματοδοτικό μονοπάτι (6).

Στη μελέτη των L.-Q. Dong et al. εκτιμήθηκε ο τροπισμός του RSV για τις διαφορετικές κυτταρικές σειρές και η αποδοτικότητα των ηπαρινασών και της ηπαρίνης χαμηλού μοριακού βάρους στην αναστολή της RSV λοίμωξης. Είναι γνωστό ότι η θειϊκή ηπαράνη (HS) ανήκει στις γλυκοζαμινογλυκάνες και κατ'επέκταση χρησιμοποιείται από πολλούς ιούς, συμπεριλαμβανομένου του RSV, για την έναρξη της αντίστοιχης λοίμωξης (7).

Από το μόριο της θειϊκής ηπαράνης είναι δυνατό να απαλοιφθούν το ιδουρονικό οξύ και ο N-σουλφιδικός δεσμός μέσω των ηπαρινασών με αποτέλεσμα την αναστολή έναρξης της αντίστοιχης λοίμωξης.

Στο πειραματικό μέρος χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικές σειρές HeLa, Hep-2, HEK293, Lo2 προερχόμενες από εμβρυονικά καρκινικά, ηπατικά και νεφρικά κύτταρα αντίστοιχα. Οι ανωτέρω κυτταρικές σειρές επωάστηκαν με ηπαρινάσες ή ηπαρίνη χαμηλού μοριακού βάρους και μολύνθηκαν in vitro από RSV.

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων, αποδείχτηκε ότι μετά από έγχυση RSV στις κυτταρικές σειρές και εικοσιτετράωρη επώαση αυτών, τα HeLa, HEK 293 και Hep-2 κύτταρα ήταν θετικά στον RSV ,εν αντιθέσει με τα Lo2 κύτταρα (7).

Με την προσθήκη ηπαρινασών ή ηπαρίνης χαμηλού μοριακού βάρους φαίνεται να μην επηρεάστηκε η λοίμωξη από RSV στα HeLa κύτταρα, ενώ για τα HEK 293 τα ποσοστά RSV λοίμωξης ήταν χαμηλότερα τουλάχιστον κατά 7% συγκριτικά με τα HEK 293 κύτταρα στα οποία δεν προστέθηκε ηπαρινάση ή ηπαρίνη χαμηλού μοριακού βάρους όπως ήταν χαμηλότερα τουλάχιστον κατά 35% τα ποσοστά λοίμωξης από RSV και για τα Hep-2 κύτταρα τα οποία επώαστηκαν με ηπαρινάση ή ηπαρίνη χαμηλού μοριακού βάρους (7).

Τελικά , παρατηρήθηκε ετερογένεια μεταξύ των N-θειούχων ομάδων και των αλλαγών στην άλυσο τηςθειικής ηπαράνης(HS) (7).

Σε άλλο πειραματικό μοντέλο, μελετήθηκε η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία στη σήψη η οποία σχετίζεται τόσο με τη γενικευμένη φλεγμονώδη απάντηση, όσο και με την ανεπάρκεια οργάνων.

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν αρουραίοι Sprague Dawley,350gr οι οποίοι χωρίστηκαν σε 2 ομάδες. Στην πρώτη ομάδα χορηγήθηκε *S.pneumoniae*  $6 \times 10^6$  cfu με αερόλυμα διαμέσου της τραχείας ενώ στη δεύτερη ομάδα (ελέγχου) χορηγήθηκε χλωριούχο νάτριο. Ο δότης υδροθείου, NaHS, εγχύθηκε σε δοσολογία 36μmol/kg/h ενδοφλεβίως. Δύο εικοσιτετράωρα μετά τον εμβολισμό με τον πνευμονιόκοκκο οι αρουραίοι τέθηκαν υπό αναισθησία και συνθήκες μηχανικού αερισμού στις οποίες και παρέμειναν για τέσσερις ώρες κι έπειτα θυσιάστηκαν. Ελήφθησαν οι πνεύμονες καθώς και βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα. Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις των IL-1β, IL-6, TNFα, CINC3 τόσο στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα όσο και στο πλάσμα. Επιπλέον μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις της αλκαλικής φωσφατάσης και των αμινοτρανσφερασών. Με βάση την ιστολογική εικόνα προσβολής του πνευμονικού παρεγχύματος τα ιστοτεμάχια κατατάχθηκαν σε αντίστοιχη κλίμακα βαρύτητας. Προ της διενέργειας αφαίμαξης απομονώθηκε ιστοτεμάχιο του ήπατος το οποίο διατηρήθηκε σε υγρό άζωτο με σκοπό την αξιόπιστη επικείμενη μέτρηση ATP και ADP (8).

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι μετά την προσθήκη πνευμονιοκόκκου αλλά προ της έγχυσης του δότη υδροθείου, NaHS, το ποσοστό θνητότητας κυμάνθηκε περί το 11%. Τα λοιπά μολυσμένα πειραματόζωα κατηγοριοποιήθηκαν σε δύο ομάδες. Η μία ομάδα έλαβε NaHS ενώ η άλλη όχι.

Η πνευμονία αύξησε την περιεκτικότητα του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος σε πρωτεΐνες στο διπλάσιο , αυξήθηκε το συνολικό βάρος του πνεύμονα κατά 0,4 γραμμάρια καθώς και η εισροή ουδετεροφίλων κατά  $2,8 \times 10^6$  neut/ml και τα επίπεδα IL-1β κατά 0,7ng/ml, IL-6 κατά 0,8 ng/ml, TNFα κατά 2,5ng/ml, CINC3 κατά 0,9ng/ml, ενώ οι ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις ήταν

βαρύτερες κατά 3 μονάδες της χρησιμοποιούμενης στη μελέτη βαθμονόμησης συγκριτικά με τα μη-μολυσμένα πειραματόζωα (8).

Ομοίως, αυξημένα ανευρέθησαν τα επίπεδα αλκαλικής φωσφατάσης στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα των μολυσμένων πειραματοζώων. Αναφορικά με τη δράση του NaHS, δεν επηρεάστηκε η βακτηριακή ανάπτυξη στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα ή σε απομακρυσμένα όργανα, ενώ υπήρξε μείωση των θετικών αιμοκαλλιεργείων σε σύγκριση με την ομάδα του χλωριούχου νατρίου, 13% έναντι 38% (8).

Με την προσθήκη NaHS μειώθηκε η καρδιακή συχνότητα, η θερμοκρασία σώματος καθώς και ο αναπνευστικός ρυθμός τόσο σε νοσούντα όσο και σε υγιή πειραματόζωα. Παράλληλα, σε μολυσμένα πειραματόζωα μειώθηκε η συγκέντρωση πρωτεϊνών στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα κατά 0,4mg/ml, η εισροή ουδετερόφιλων κατά  $1,8 \times 10^6$  neuts/ml και ο συνολικός αριθμός κυττάρων κατά  $2,1 \times 10^6$  κύτταρα/ml όπως και τα επίπεδα της IL-6 κατά 0,7ng/ml και του TNF $\alpha$  κατά 1,6ng/ml. Σημειώνεται ότι η αναστολή της φλεγμονώδους διεργασίας από την προσθήκη NaHS αντανακλάται και στην ιστοπαθολογική εικόνα του πνεύμονα.

Όσον αφορά τη μιτοχονδριακή λειτουργία, η έγχυση NaHS αύξησε κατά 150% την έκφραση της ηπατικής PCG-1 $\alpha$  η οποία αποτελεί τον κύριο μεταγραφικό παράγοντα των μιτοχονδρίων, ενώ παράλληλα αυξήθηκε η έκφραση της NADH1 κατά 160% και NADH6 κατά 150%, γεγονόςτα τα οποία οδηγούν στην ενίσχυση της μιτοχονδριακής βιογένεσης (8).

Συνολικά, είναι γνωστό ότι στη σήψη οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου οδηγούν σε μιτοχονδριακή βλάβη. Ο δότης υδροθείου NaHS περιορίζει τη μιτοχονδριακή βλάβη αυξάνοντας την έκφραση του κλάσματος των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών οι οποίες επάγουν τον VDAC, συμπεριλαμβανομένων της  $\alpha$ -tubulin και PKC $\epsilon$ , με στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα. Ο VDAC θεωρείται σημαντικός ρυθμιστής της μιτοχονδριακής αναπνοής. Παράλληλα, μειώνονται τα επίπεδα mtDNA στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα, αποτελώντας έναν επιπλέον δείκτη περιορισμού της μιτοχονδριακής βλάβης (8).

#### Ο ρόλος του υδροθείου στις λοιμώξεις του αναπνευστικού

Μέσα από πειραματικές διαδικασίες και μελέτες γίνεται προσπάθεια ταυτοποίησης του ρόλου του υδροθείου τόσο στις λοιμώξεις αναπνευστικού, όσο και σε άλλες αναπνευστικές νόσους.

Αναφέρεται ότι το υδροθείο παρέχει αντιφλεγμονώδη, κυτταροπροστατευτική και αγγειογενετική δράση διαμεσολαβώντας σε διάφορες

διεργασίες . Το ελεύθερο υδροθείο οξειδώνεται στα μιτοχόνδρια από το ένζυμο SQR(Sulfide Quinone Reductase) ή μεθυλιώνεται στο κυτταρόπλασμα χρησιμοποιώντας τη θειονίνη-S-μεθυλτρανσφεράση. Ως ελεύθερο μόριο είναι δυνατό να δεσμευτεί από τη μεθαιμοσφαιρίνη και από μόρια με μεταλο- ή δισουλφικούς δεσμούς. Τα κύτταρα των διάφορων ιστών εκφράζουν συνήθως και τα τρία ένζυμα άλλοτε σε διαφορετικά επίπεδα. Στο αναπνευστικό υπάρχουν ανιχνεύσιμες ποσότητες τόσο του CSE όσο και του CBS.

Ο ρόλος του υδροθείου στη φυσιολογία και την ανάπτυξη του πνεύμονα είναι σημαντικός αφού φαίνεται να διαμεσολαβεί τον κεντρικό έλεγχο της ρύθμισης της αναπνοής(10). Η εξωγενής χορήγηση υδροθείου μπορεί να επηρεάσει την αναπνευστική δραστηριότητα με διφασικό τρόπο, μειώνοντας την αναπνευστική συχνότητα κατά το αρχικό στάδιο με ακόλουθη αύξησή της σε μεταγενέστερα στάδια μέσω του μηχανισμού διάνοξης των  $K_{ATP}$  διαύλων και ενεργοποίησης του μονοπατιού cAMP. Επιπλέον, η εξωγενής χορήγηση του GYY4137 το οποίο είναι δότης βραδείας αποδέσμευσης υδροθείου αυξάνει την παραγωγή υδροθείου με συνέπεια την επανέναρξη της δημιουργίας κυψελίδων σε πειραματικό μοντέλο βρογχοπνευμονικής δυσπλασίας. Έτσι, φαίνεται ότι το υδροθείο κατέχει ρόλο στην ανάπτυξη της πνευμονικής αγγείωσης και των κυψελίδων. Ομοίως, θετική επίδραση στην φυσιολογική ανάπτυξη του πνεύμονα ασκείται και από την δραστηριότητα των CBS και CSE αφού η αναστολή της δραστηριότητάς τους οδηγεί σε σημαντική αναστολή της βρογχοαγγειακής ανάπτυξης του πνεύμονα τόσο σε in vivo όσο και σε in vitro πειραματικά μοντέλα (9).

Θέση κατέχει το υδροθείο και σε διάφορες πνευμονικές νόσους. Επιγραμματικά, στο άσθμα ελλιπής έκφραση του ενζύμου CSE είχε ως αποτέλεσμα την αυξημένη υπεραντιδραστικότητα στο αναπνευστικό σύστημα(AHR), διαπιστωμένη με δοκιμασία μεταχολίνης καθώς και την αυξημένη φλεγμονή τοπικά. Στην χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, η ενδογενής παραγωγή υδροθείου ασκεί προστατευτικό ρόλο ως προς τα επιθηλιακά κύτταρα τόσο σε πειραματικά μοντέλα μυών και αρουραίων, όσο και σε ανθρώπους. Σε κλινική μελέτη ασθενών με κυστική ίνωση συσχετίζονται αρνητικά τα επίπεδα υδροθείου με το ποσό των πτυέλων των ασθενών ενώ σε λοίμωξη αναπνευστικού από RSV φαίνεται να μειώνεται η έκφραση mRNA για το CSE και κατά συνέπεια να παράγονται χαμηλότερα επίπεδα υδροθείου (9).

Έχει φανεί σε ζωικά μοντέλα ότι η προθεραπεία με GYY4137 προ της εισπνοής λιποπολυσακχαρίτη (LPS), αναστέλλει τη μετανάστευση και την ενεργοποίηση των ουδετεροφίλων στον πνεύμονα η οποία αναστέλλει την πνευμονική βλάβη και την τοπική φλεγμονή. Συγκεκριμένα, κατά το πείραμα των Simone Faller et al. χρησιμοποιήθηκαν μύες C57BL/6N που χωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες. Στην πρώτη ομάδα (ελέγχου) εγχύθηκε ενδοπεριτοναϊκά PBS (Phosphate Buffered Saline). Ακολούθησε έκθεση σε PBS μέσω αερολύματος και κατόπιν τα πειραματόζωα παρέμειναν σε τεχνητό αερισμό για 6 ώρες. Στη δεύτερη ομάδα(ελέγχου-GYY4137) εγχύθηκε ενδοπεριτοναϊκά GYY4137 σε

δοσολογία 250mg/kg σωματικού βάρους και κατόπιν ακολούθησε έκθεση σε τεχνητό αερισμό για 60 λεπτά. Εν συνεχεία ελήφθη PBS μέσω αερολύματος και παρέμειναν σε τεχνητό αερισμό για 6 επιπλέον ώρες. Στην Τρίτη ομάδα (LPS) οι μύες έλαβαν PBS ενδοπεριτοναϊκά και στη συνέχεια τέθηκαν σε μηχανικό αερισμό για 60 λεπτά. Ακολούθησε έκθεση σε αερόλυμα PBS και υποβολή σε τεχνητό αερισμό για 6 επιπλέον ώρες. Στην τέταρτη ομάδα (LPS+GYY4137), εγχύθηκε ενδοπεριτοναϊκά GYY4137 σε δοσολογία 250 mg/kg και κατόπιν ακολούθησε έκθεση σε τεχνητό αερισμό για 60 λεπτά. Εν συνεχεία εκτέθηκαν σε 0,05mg LPS μέσω αερολύματος και υπεβλήθησαν σε τεχνητό αερισμό για 6 επιπλέον ώρες (10). Ως προς τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι η προσθήκη μεμονωμένα λιποπολυσακχαρίτη με επώαση 6 ωρών οδήγησε σε λέπτυνση του τοιχώματος των βρογχιολίων κατά 1μm, γεγονός το οποίο υπέστρεψε με την προσθήκη δότη υδροθείου (GYY4137). Παράλληλα με την προσθήκη δότη υδροθείου κατεγράφη σημαντική μείωση στον αριθμό των ουδετεροφίλων στο πνευμονικό παρέγχυμα έως 15% σε αντίθεση με τη δράση που είχε ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS) μεμονωμένα. Ως προς τη φλεγμονώδη απάντηση στον πνευμονικό ιστό ,παρατηρήθηκε ότι η προσθήκη λιποπολυσακχαρίτη ανέστειλλε την έκφραση MIP-2 mRNA, ενός μορίου το οποίο αποτελεί βασικό χημειοτακτικό παράγοντα και απελευθερώνεται ακολουθώντας την LPS σε πολλαπλούς τύπους πνευμονικών κυττάρων. Όμοια αποτελέσματα αναλύθηκαν και ως το CXCR2 mRNA ,χωρίς ωστόσο στατιστική σημαντικότητα (10).

Αναφορικά με την MIP-2 , η προσθήκη δότη υδροθείου μείωσε σημαντικά το ποσοστό της κατά 10pg/ml , σε αντίθεση με την αντίστοιχη προσθήκη LPS, ενώ ταυτόχρονα αποτελεί δεδομένο ότι ο GYY4137 τείνει να μειώνει την ανεύρεση της προφλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-1β συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου περίπου κατά 60%. Τα ανωτέρω ευρήματα συνηγορούν στη μείωση της μετανάστευσης των ουδετεροφίλων και μείωσης της φλεγμονής στον πνευμονικό ιστό κατά την προσθήκη δότη υδροθείου. Σε συνέχιση της πειραματικής διαδικασίας, αναφέρεται ότι στα τροποποιημένα Hoxb8 ουδετερόφιλα δεν ανεδείχθη διαφορά στη ζωτικότητα μετά από 24ωρη ή όχι επώαση με τον GYY4137. Αποκλείστηκε, συνεπώς, πιθανή τοξικότητα κατά τη διαδικασία. Σημειώνεται ότι η επώαση των ουδετεροφίλων με τον δότη υδροθείου *in vitro* οδήγησε σε μειωμένη χημειοταξία αυτών στο πνευμονικό ενδοθήλιο. Συμπερασματικά, ενώ κατά την οξεία πνευμονική βλάβη αυξάνεται το πάχος του τοιχώματος των βρογχιολίων, φαίνεται η δράση αυτή να μην ευοδώνεται από την χορήγηση δότη αργής αποδέσμευσης υδροθείου –GYY4137 στους μύες (10).

Στα πλαίσια αξιολόγησης του θεραπευτικού αποτελέσματος του GYY4137-δότης βραδείας αποδέσμευσης υδροθείου ως προς την πρόληψη και τη θεραπεία της αναπνευστικής βλάβης από RSV λοίμωξη, πραγματοποιήθηκε η μελέτη των Teodora Ivanciuc et al. Στο πειραματικό αυτό μοντέλο χρησιμοποιήθηκαν BALB1c μύες, ηλικίας 10-12 εβδομάδων οι οποίοι έλαβαν

GY4137 καθώς και μύες C57BL/6J γενετικά τροποποιημένοι ,με έλλειψη ενζύμου CSE (CSE knock-out) (11).

Οι μύες μολύνθηκαν ενδορινικά με 50μl RSV αραιωμένο σε PBS(phosphate-buffered saline). Οι μύες με γενική έλλειψη CSE χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος του υδροθείου στην παθογένεια λοίμωξης από RSV. Καθημερινά καθοριζόταν το σωματικό βάρος των πειραματόζων και η βαρύτητα της νόσου, λάμβανε χώρα μέτρηση ουδετεροφίλων στον πνευμονικό ιστό με κυτταρομετρία ροής και κυττάρων στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα, καταγράφονταν οι κυτταροκίνες, οι χημειοκίνες και ο ιϊκός τίτλος στον πνευμονικό ιστό. Παράλληλα πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες αναπνευστικής λειτουργίας και καθορίστηκε η ιστοπαθολογία του πνευμονικού παρεγχύματος, ενώ αναλύθηκε και η έκφραση CSE m RNA και CBS m RNA μέσω της μεθόδου real-time PCR (11).

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων αποδείχθηκε ότι η λοίμωξη των μυών οδήγησε σε μειωμένη έκφραση τόσο του CBS όσο και του CSE στον πνεύμονα. Θετικά αποτελέσματα ως προς διαφορετικές παραμέτρους της λοίμωξης από RSV παρατηρήθηκαν όταν ο GY4137 χορηγήθηκε προ της έναρξης της λοίμωξης. Κατεγράφη στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τη συνολική νοσηρότητα ανάμεσα στους μύες οι οποίοι έλαβαν θεραπεία με δόση υδροθείου και σε εκείνους οι οποίοι δεν έλαβαν, με μείωση τουλάχιστον κατά 5% του σωματικού βάρους στην ομάδα η οποία δεν έλαβε GY4137.

Συμπληρωματικά, διενεργήθηκε και δοκιμασία μεταχολίνης η οποία δεν προκάλεσε υπεραντιδραστικότητα στον πνευμονικό ιστό ως όφειλε κατά τη λοίμωξη από RSV. Αντίθετα φάνηκε να αναστέλλεται η υπεραντιδραστικότητα του πνεύμονα σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο σε μύες οι οποίοι έλαβαν προθεραπεία με δόση υδροθείου συγκριτικά με τους λοιπούς πληθυσμούς των μυών που συμμετείχαν στη μελέτη.

Επιπλέον, θεραπεία με δόση υδροθείου 6 ώρες μετά τη μόλυνση με RSV μείωσε επιτυχώς τον ιϊκό τίτλο στον πνεύμονα, κατά 24%. Ταυτόχρονα, ανεδείχθη μείωση της κυτταρικής διήθησης περιβρογχικά και περιαγγειακά στον πνευμονικό ιστό με τη χορήγηση GY4137 συγκριτικά με τους μύες που είχαν έλλειψη CSE , καθώς και αναστολή των προφλεγμονωδών και άλλων κυτταροκινών, οι οποίες μετρήθηκαν από το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα(IL-1α, IL-1β, IL-6, TNFα, GM-CSF, G-CSF). Αναφορικά με τους μύες με έλλειψη CSE οι οποίοι δεν παράγουν υδροθείο λόγω της γενετικής τροποποίησης παρατηρήθηκε σημαντικά υψηλότερος τίτλος των TNFα, IL-6, IL-12, IL-13 συγκριτικά με τον γενετικά μη- τροποποιημένο πληθυσμό μυών. Συνολικά , το υδροθείο φάνηκε από αυτή τη μελέτη να κατέχει προστατευτικό ρόλο έναντι της λοίμωξης από RSV in vivo, τροποποιώντας τόσο τη φλεγμονώδη απάντηση, όσο και τον ιϊκό πολλαπλασιασμό με σημαντική μείωση του μέγιστου ιϊκού φορτίου στον πνεύμονα και της επαγόμενης από την RSV λοίμωξης υπεραντιδραστικότητας στο επίπεδο του πνευμονικού ιστού (11).

Με σκοπό την ανάλυση και αξιολόγηση των κινητικών αποτελεσμάτων της προ- ή μετά-θεραπείας με υδροθείο σε συνθήκες μηχανικού αερισμού ως προς την πνευμονική βλάβη, τη φλεγμονή στο επίπεδο του πνεύμονα και το οξειδωτικό στρες που επάγεται από τον μηχανικό αερισμό, πραγματοποιήθηκε η μελέτη των Simone Faller et al. (12).

Η πνευμονική βλάβη επαγόμενη από τον αναπνευστήρα(VILI) χαρακτηρίζεται από ασυνέχεια του πνευμονικού ιστού, σχηματισμό οιδήματος, αυξημένη παραγωγή ενεργών ριζών του οξυγόνου και δημιουργία φλεγμονώδους απάντησης. Παθοφυσιολογικά φαίνεται να οφείλεται στην έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών( IL-1β) και μετανάστευση των ουδετεροφίλων στα βρογχιόλια καθώς και στην εξεσημασμένη παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου (12).

Από τα αποτελέσματα της μελέτης φάνηκε ότι η θεραπεία με εισπνεόμενο υδροθείο, πριν τη χρήση μηχανικού αερισμού οδήγησε στη μείωση της λέπτυνσης του τοιχώματος των βρογχολίων και επιπλέον, όσο αυξανόταν ο χρόνος εισπνοής υδροθείου τόσο βελτιωνόταν η παράμετρος αυτή. Σημειώνεται, επίσης, ότι έκθεση σε υδροθείο για 1, 3,5 ώρες προ της χρήσης μηχανικού αερισμού οδήγησε σε μείωση της συσσώρευσης ουδετεροφίλων στον πνευμονικό ιστό κατά 10%, ενώ προθεραπεία για 6 ώρες σχεδόν ανέστειλε τη συσσώρευσή τους, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Αναφορικά με την πνευμονική βλάβη σχετιζόμενη με αναπνευστήρα, η χορήγηση εισπνεόμενου υδροθείου φάνηκε να την προλαμβάνει πλήρως ή μερικώς(12).

Από την άλλη πλευρά, με βάση τα αποτελέσματα από την χρήση εισπνεόμενου υδροθείου κατά τη χρήση μηχανικού αερισμού, ανευρέθη ελάχιστη μείωση των κυτταροκινών μετά από 6 ώρες αερισμού με υδροθείο σε ποσοστό < 1%. Το υδροθείο προστέθηκε 1 ή 3 ώρες μετά την έναρξη ή ταυτόχρονα με την έναρξη χρήσης μηχανικού αερισμού. Επιπλέον, μειώθηκε η εισροή των ουδετεροφίλων στα βρογχιόλια, ενώ ο αυξημένος χρόνος χρήσης του υδροθείου σε συνδυασμό με τον μηχανικό αερισμό οδήγησε σε μειωμένη παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου συγκριτικά με τις ομάδες ελέγχου (12).

Συγκριτικά με την ομάδα η οποία δεν τέθηκε υπό μηχανικό αερισμό, παρατηρήθηκε αύξηση της παραγωγής της προφλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-1β κατά την 6ωρη χορήγηση υδροθείου σε μοντέλο μηχανικού αερισμού. Το οξειδωτικό στρες αυξήθηκε μετά τη 6ωρη χρήση μηχανικού αερισμού, στα πλαίσια αύξησης των ελεύθερων ριζών οξυγόνου και κατόπιν μειώθηκε μετά την προσθήκη υδροθείου.

Συνολικά, συμπεραίνεται ότι η προθεραπεία με υδροθείο προ της χρήσης μηχανικού αερισμού οδηγεί στη μειωμένη δημιουργία ελεύθερων ριζών οξυγόνου, ενώ η προσθήκη υδροθείου μετά την έναρξη χρήσης μηχανικού αερισμού, προστατεύει έναντι της πνευμονικής βλάβης από αναπνευστήρα(VILI) (12).



Αξίζει να σημειωθεί η μελέτη των Nikolay Bazhanov et al. σχετικά με την αντιϊκή και αντιφλεγμονώδη δράση του GYY4137, βραδείας αποδέσμευσης δότη υδροθείου, στην ανάπτυξη των RNA ιών, όπως των Ortho-, Filo-, Flavi- και Bunya-ιοί (13). Τα αποτελέσματα της μελέτης δείχνουν ότι στα υπερκείμενα των κυττάρων τα οποία μολύνθηκαν με στέλεχος γρίππης H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> και H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>, ο ιϊκός τίτλος ήταν μειωμένος ως απάντηση στη χορήγηση GYY4137 μεδοσοεξαρτώμενο τρόπο (5 mM και 10 mM συγκέντρωση). Επιπλέον στα πλαίσια της πειραματικής διαδικασίας προστέθηκε m RNA και πρωτεΐνες του ιού σε διάφορες φάσεις του κύκλου πολλαπλασιασμού του ιού, αναδεικνύοντας τελικά μείωση των ιϊκών πρωτεϊνών.

Ακολούθως, προστέθηκε GYY4137 και σε ιούς EBOV (Recombinant Zaive Ebola Virus), RSSEV (Far-eastern tick-borne flavivirus), CCHFV (Crimean –Congo hemorrhagic fever virus) και RVFV (Rift Valley Fever Virus) οπότε και ανεδείχθη σημαντική μείωση του ιϊκού πολλαπλασιασμού έως και 10<sup>4</sup>, συγκριτικά με κύτταρα στα οποία δεν προστέθηκε GYY4137 (13).

Όμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και σε επίπεδο προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών και χημειοκινών (IL-1β, IL-6, IL-8, TNFα). Τόσο οι χημειοκίνες, κυτταροκίνες όσο και τα μόρια DAMPs και PAMPs μειώθηκαν μετά την προσθήκη GYY4137, με συνέπεια τη μείωση των εισερχόμενων στο αναπνευστικό επιθήλιο ουδετεροφίλων, μακροφάγων και κυτταροτοξικών T-κυττάρων με ακόλουθη μείωση της φλεγμονώδους βλάβης του αναπνευστικού επιθηλιακού ιστού. Σε επίπεδο κυτταρικής σηματοδότησης, φαίνεται ότι η προσθήκη GYY4137 μειώνει την μετάθεση στον πυρήνα των IRF-3 και NF-κB -εξαρτώμενων από την ενεργοποίηση των TLR-3 και RIG-1 και κατ'επέκταση τη σηματοδοτική διαδικασία για την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών (13).

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### Ο ρόλος του υδροθείου στην πρόγνωση της νόσου Covid-19

Από το Δεκέμβριο του έτους 2019, η ανθρωπότητα είναι αντιμέτωπη με μία νέα πανδημία από τον SARS-CoV-2 νέο κορωνοϊό ο οποίος προκαλεί τη νόσο Covid-19. Έως τη 16<sup>η</sup> Ιουνίου έχουν καταγραφεί 177.000.000 μολύνσεις και 3.820.000 θάνατοι, παγκοσμίως. Η κύρια αιτία θανάτου είναι η σοβαρή αναπνευστική ανεπάρκεια που αναπτύσσεται στα πλαίσια πνευμονίας της κοινότητας. Φαίνεται ότι η διαταραχή του αναπνευστικού ενδοθηλίου αποτελεί το κύριο χαρακτηριστικό της παθογένειας της νόσου. Αυτή η υπόθεση δημιουργήθηκε μετά τη δημοσίευση δεδομένων τα οποία αποδεικνύουν ότι τα επίπεδα δ-διμερών καθώς και αυξητικού παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου είναι αυξημένα στους νοσούντες.

Το υδρόθειο είναι γνωστό ότι προέρχεται και από το ενδοθήλιο και οδηγεί σε αγγειογένεση, προαγωγή της αγγειοδιαστολής, μείωση της αθηροσκλήρυνσης καθώς και πρόληψη ισχαιμικών βλαβών. Παρόλο που ήταν γνωστή η άσκηση των αντιφλεγμονωδών δράσεων του μέσω της αναστολής του πυρηνικού παράγοντα-κΒ(NF-κΒ), αποδείχτηκε πρόσφατα σε πειραματικό μοντέλο η αλληλεπίδραση του υδροθείου με την αγγειοτενσίνη-2, η οποία με τη σειρά της αποτελεί και τον υποδοχέα που χρησιμοποιεί ο SARS-CoV-2 νέος κορωνοϊός ώστε να εισέλθει στο ενδοθήλιο. Με βάση την ανωτέρω παρατήρηση προτείνουμε ότι το υδρόθειο κατέχει κεντρική θέση στην παθογένεια της νόσου Covid-19 και μελετήσαμε τα επίπεδα υδροθείου στον ορό ασθενών με πνευμονία Covid-19 σχετικά με την έκβαση της νόσου. Με δεδομένες τις αντιφλεγμονώδεις δράσεις του υδροθείου, υποθέσαμε ότι υψηλά επίπεδα υδροθείου ορού σχετίζονται με επιθυμητή έκβαση της πνευμονίας Covid-19.(14)

Στην μελέτη η οποία πραγματοποιήθηκε συμμετείχαν συνολικά 74 νοσούντες από Covid-19. Δεδομένα συλλέχθηκαν και οι προγνωστικοί δείκτες επιβίωσης υπολογίστηκαν. Δείγμα αίματος ελήφθη εικοσιτέσσερις ώρες μετά την εισαγωγή τους( 1<sup>η</sup> ημέρα) και την 7<sup>η</sup> ημέρα. Το υδρόθειο μετρήθηκε με MBB (παράγωγο του μονοβρωμοδιμείου) ακολουθούμενο από υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης και συσχετίστηκε με άλλους δείκτες όπως η προκαλσιτονίνη, η c-αντιδρώσα πρωτεΐνη, ο παράγοντας νέκρωσης όγκου –α και η ιντερλευκίνη-6 οι οποίες επίσης μετρήθηκαν στον ορό. Πιο συγκεκριμένα η μελέτη διεξήχθη σε οκτώ κέντρα, ξεκινώντας από το Μάρτιο 2020. Το πρωτόκολλο της μελέτης εκρίθηκε από την επιτροπή δεοντολογίας όλων των συμμετέχοντων κέντρων. Οι ασθενείς συμμετείχαν κατ'όπιν γραπτής συναίνεσης δικής του ή συγγενούς

πρώτου βαθμού, σε περίπτωση που ο ίδιος ο ασθενής δεν ήταν σε θέση να λάβει απόφαση για τον εαυτό του. Συμμετείχαν ασθενείς με λοίμωξη κατώτερου αναπνευστικού οι οποίοι είχαν απεικονιστικά ευρήματα από ακτινογραφία ή αξονική τομογραφία θώρακος συμβατά με τη διάγνωση και μοριακό τεστ θετικό για SARS-CoV2. Αιμοληψία πραγματοποιήθηκε κατά το πρώτο εικοσιτετράωρο νοσηλείας και μετά από επτά ημέρες. Κριτήρια αποκλεισμού αποτελούσαν: 1. Λοίμωξη από ιό ανθρώπινης ανοσολογικής ανεπάρκειας-1, 2. ουδετεροπενία με  $<1000$  ουδετερόφιλα/ $\text{mm}^3$ . Ως σοβαρή αναπνευστική ανεπάρκεια ορίστηκε αναπνευστικό πηλίκιο (μερική πίεση οξυγόνου προς εισπνεόμενο μίγμα οξυγόνου) χαμηλότερο από 200 και ταυτόχρονη ανάγκη μηχανικού αερισμού.

Οι ακόλουθες μεταβλητές κατεγράφησαν: 1.δημογραφικά στοιχεία, 2.ζωτικά σημεία, 3.αξιολόγηση οξείας φυσιολογίας κατά την προσέλευση και χρόνια αξιολόγηση της υγείας (APACHE II score), δείκτης συννοσηροτήτων κατά Charlson (CCI), αξιολόγηση διαδοχικής οργανικής ανεπάρκειας (SOFA), Δείκτης βαρύτητας πνευμονίας (PSI) 4. Απόλυτος αριθμός κυτταρικών σειρών στο περιφερικό αίμα και βιοχημικός έλεγχος κατά την προσέλευση και κατά την παρακολούθηση των ασθενών καθώς και η επιβίωση στις 28 ημέρες. (Πίνακας 1,2)

Πίνακας 1 Βασικές εργαστηριακές τιμές ασθενών με πνευμονία από SARS-CoV2 κορωνοϊό με βάση την τελική κατανομή.

|   | Επιζώντες(n=64) | Μη-επιζώντες (n=10) | Τιμή-p |
|---|-----------------|---------------------|--------|
| Αιμοσφαιρίνη (g/dl)                                 | 13.72 ± 1.65    | 12.68 ± 1.67        | 0.083  |
| Λευκά αιμοσφαίρια (/mm <sup>3</sup> )               | 6021 ± 2476     | 7835 ± 3934         | 0.174  |
| Αιμοπετάλια<br>(x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> ) | 192.9 ± 75.6    | 199.6 ± 58.0        | 0.630  |
| INR   | 1.05 ± 1.12     | 1.11 ± 0.13         | 0.228  |
| aPTT (secs)   | 35.12 ± 5.81    | 33.25 ± 8.24        | 0.302  |
| Ινωδογόνο (mg/dl)                                   | 594.38 ± 183.2  | 662.2 ± 204.9       | 0.363  |
| Δ-διμερή (g/dl)                                     | 2.32 ± 3.18     | 4.50. ± 2.84        | 0.194  |
| Κρεατινίνη (mg/dl)                                  | 1.02 ± 0.80     | 0.93 ± 0.24         | 0.686  |
| Ολική χολερυθρίνη (mg/dl)                           | 0.659 ± 0.34    | 0.71 ± 0.38         | 0.404  |
| AST (U/l)   | 39.00 ± 24.24   | 52.50 ± 23.26       | 0.082  |
| ALT (U/l)   | 34.82 ± 23.43   | 38.30 ± 23.02       | 0.626  |

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση. Οι συγκρίσεις πραγματοποιήθηκαν με Student's t-test.

**Πίνακας 2. Βασικά κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά των ασθενών με πνευμονία από SARS-CoV2 κορονοϊό και step-wise forward cox regression ανάλυση των παραμέτρων που σχετίζονται με δυσμενή πρόγνωση.**

|  | Μονοπαραγοντική<br>Ανάλυση |                            | Πολυπαραγοντική<br>Ανάλυση |       | 95% CIs        | Τιμή-<br>ρ |
|--|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-------|----------------|------------|
|  | Επιζώντες<br>(v=64)        | Μη-<br>επιζώντες<br>(v=10) | Τιμή-<br>ρ                 | HR    |                |            |
| Ηλικία ≥ 64 ετών (v, %) <sup>#</sup>                   | 27 (42.2)                  | 8 (80)                     | 0.005                      | 19.00 | 0.92 – 391.00  | 0.056      |
| Ανδρικό φύλο (v, %)                                    | 45 (70.3)                  | 9 (90.0)                   | 0.269                      |       |                |            |
| CCI ≥ 3 (v, %) <sup>#</sup>                            | 14 (21.9)                  | 7 (70.0)                   | 0.004                      | 2.08  | 0.17 – 25.26   | 0.566      |
| APACHE II score ≥ 10 (v, %) <sup>#</sup>               | 11 (17.2)                  | 5 (50.0)                   | 0.033                      | 16.35 | 0.44 – 612.87  | 0.131      |
| PSI ≥ 113 (v, %) <sup>#</sup>                          | 13 (20.3)                  | 7 (70.0)                   | 0.0002                     | 4.88  | 0.27 – 88.17   | 0.283      |
| SOFA ≥ 4 (v, %) <sup>#</sup>                           | 7 (10.9)                   | 2 (20.0)                   | 0.005                      | 1.76  | 0.15 – 20.65   | 0.652      |
| H <sub>2</sub> S ορού ημέρα 1 ≥ 150.44 μM <sup>#</sup> | 47 (73.4)                  | 2 (20.0)                   | 0.011                      | 0.01  | 0.01 - 0.519   | 0.022      |
| Συννοσηρότητες(v, %)                                   |                            |                            |                            |       |                |            |
| Σακχαρώδης διαβήτης τύπου II                           | 4 (6.3)                    | 2 (20.0)                   | 0.184                      |       |                |            |
| Χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια                             | 1 (1.6)                    | 0 (0)                      | 0.865                      |       |                |            |
| Στεφανιαία νόσος                                       | 17 (26.6)                  | 3 (30.0)                   | 0.543                      |       |                |            |
| Χρόνια νεφρική νόσος                                   | 5 (7.8)                    | 3 (30.0)                   | 0.070                      |       |                |            |
| ΧΑΠ  | 3 (4.7)                    | 0 (0)                      | 0.642                      |       |                |            |
| Σοβαρή αναπνευστική ανεπάρκεια                         | 16 (25)                    | 9 (90)                     | 0.0001                     | 41.95 | 1.49 – 1183.15 | 0.028      |

Συντομογραφίες: HR: Hazard ratio; CI: Confidence intervals; SD: standard deviation; H<sub>2</sub>S: hydrogen sulfide; APACHE: acute physiology and chronic health evaluation; CCI: Charlson's comorbidity index; ΧΑΠ: χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια; PSI: pneumonia severity index; SOFA: sequential organ failure;

Οι τιμές-ρ μετά από σύγκριση με Fischer exact test παρατίθενται.

<sup>#</sup>Το σημείο αποκοπής της κάθε μεταβλητής καθορίστηκε με βάση το σημείο των συντεταγμένων με την ανώτερη τιμή του δείκτη Youden.

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

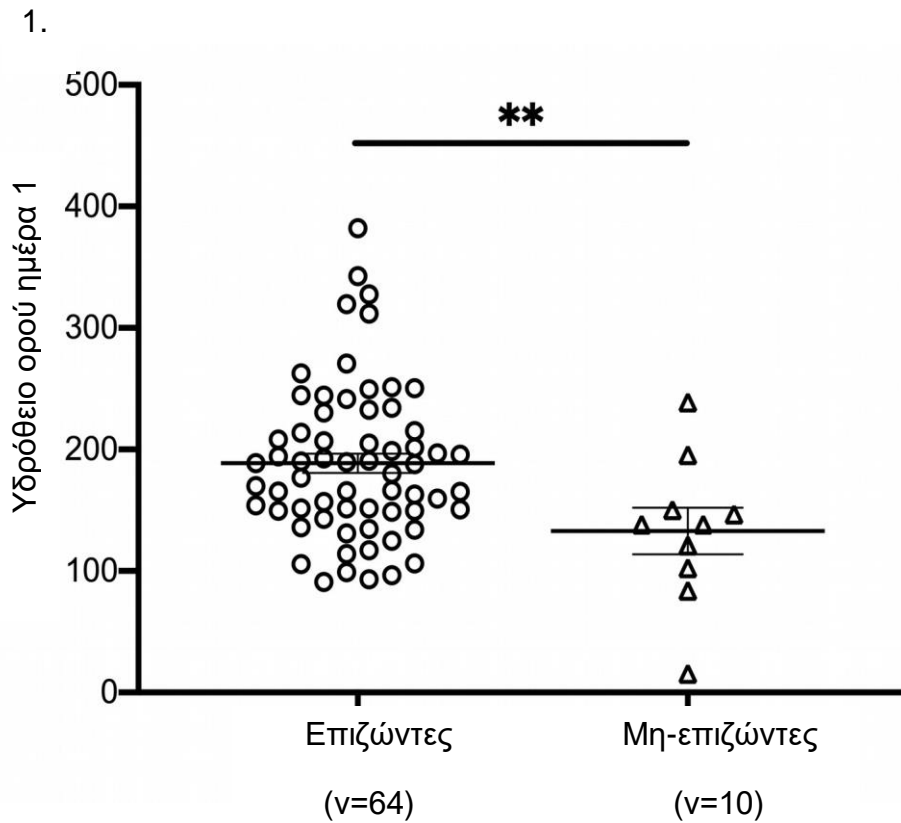
Άμεσα μετά την αιμοληψία, το αίμα συλλεγόταν σε αποστειρωμένα σωληνάρια και μεταφερόταν σε λιγότερο από δέκα λεπτά υπό συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας για φυγοκέντρηση. Το υδρόθειο μετρήθηκε στον ορό των ασθενών χρησιμοποιώντας παράγωγο του μονοβρωμοδιμεπίου (MBB) ακολουθούμενο από υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως. Για την προετοιμασία του ρυθμιστικού διαλύματος παραγωγοποίησης (Tris-HCl 0.1M Ph 9.5, 0.1Mm DTPA) DTPA διαλύθηκε σε τρι-υδροχλωρικό (Tris-HCl). Όλα τα διαλύματα και τα ρυθμιστικά διαλύματα καθώς και τα σωληνάρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγοποίηση, αποξυγονώθηκαν με χρήση αερίου αζώτου (10'' έως 30''). Τα διαλύματα για την πρότυπη καμπύλη θειούχων προετοιμάστηκαν με τη διάλυση Na<sub>2</sub>S σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, με τελική συγκέντρωση 4-250 μM και όριο ποσοτικοποίησης τα 10 Μμ. Το MBB 10mM διάλυμα παραγωγοποίησης δημιουργήθηκε με διάλυση MBB σε ακετονιτρίλιο και διατηρήθηκε σε σκοτεινό περιβάλλον στον -20°C. Διάλυμα τερματισμού αντίδρασης SSA παρασκευαζόταν εκ νέου πριν από κάθε μέτρηση με τη διάλυση SSA σε απεσταγμένο νερό. Η προετοιμασία των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε υπό συνθήκες χαμηλού φωτισμού. Μετά την αποξυγόνωση, 30 μl από το δείγμα ορού, 70 μl Tris-HCl 0.1M pH 9.5 0.1Mm DTPA και 50 μl MBB 10 mM προστέθηκαν στα σωληνάρια. Στη συνέχεια επωάστηκαν σε υποξικές συνθήκες (1% O<sub>2</sub>) στους 37° για 60 λεπτά. Η αντίδραση παραγωγοποίησης ολοκληρώθηκε με την προσθήκη 50 μl από το SSA 200 mM με ακόλουθη ανάδευση διάρκειας 10 δευτερολέπτων. Έπειτα τα φιαλίδια εναποτέθηκαν σε πάγο για δέκα λεπτά και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν σε 12000rpm, 4°C για δέκα επιπλέον λεπτά. Τέλος, 100 μl από κάθε υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε σκουρόχρωμα φιαλίδια HPLC για αποφυγή έκθεσης στο φως στους 4°C. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε από Agilent 1100 HPLC system (Agilent, Waldbronn, Germany) χρησιμοποιώντας μία LiChroCART Reverse-Phase (RP) C18 4.6 x 250mm, 5 μM στήλη (Merck, Darmstadt, Germany). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στους 25°C. Οι κινητές φάσεις αποτελούσαν από ακετονιτρίλιο (0.1% TFA, v/v) και νερό (0.1% TFA, v/v), σε ροή 0.6ml/min. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε κύματα διέγερσης και εκπομπής 390 nm και 475 nm, αντίστοιχα. Ο χρόνος συντήρησης του παραγωγοποιημένου προϊόντος ήταν 12.7 λεπτά. Ο παράγοντας νέκρωσης όγκου-α (TNFα) και η ιντερλευκίνη-6 (IL-6) μετρήθηκαν εις διπλούν με ενζυμική ανοσοδοκιμασία (R & D, Minneapolis, USA). Το ελάχιστο όριο ανίχνευσης ήταν 40 pg/ml για τον TNFα και 10 pg/ml για την IL-6. Η προκαλσιτονίνη (PCT) μετρήθηκε με τεχνολογία κρυπτογραφημένης εκπομπής στηριζόμενη στο χρόνο με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή (Kryptor, Brahms, Hennigsdorf, Germany). Το ελάχιστο όριο ανίχνευσης ήταν τα 0.06 ng/ml. Η c-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) μετρήθηκε εις διπλούν με νεφελομετρική μέθοδο (Behring, Berlin, Germany). Το ελάχιστο όριο ανίχνευσης ήταν 0.2 mg/dl.

## ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η στατιστική ανάλυση κατηγορικών δεδομένων παρουσιάστηκε με μεταβλητές συχνότητων και ποιοτικές μεταβλητές ως μέση (mean)  $\pm$  SE. Η σύγκριση μεταξύ των ομάδων πραγματοποιήθηκε με Fischer exact test για τις κατηγορικές μεταβλητές και με two- sided Student's test ή δοκιμασία Mann-Whitney για τις ποιοτικές μεταβλητές. Οι συσχετίσεις έγιναν με χρήση Spearman's rank. Η επιβίωση συγκρίθηκε με χρήση log-rank test. Οι αναλογίες πιθανοτήτων και τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης- confidence intervals (CIs) υπολογίστηκαν με στατιστική Mantel and Haenszel's. Καμπύλες ROC αναλύθηκαν για την πρόβλεψη του αποτελέσματος. Επιπλέον χρησιμοποιήθηκε ο δείκτης Youden. Η stepwise forwards Cox regression ανάλυση με τα hazard ratios (HRs) και τα διαστήματα εμπιστοσύνης χρησιμοποιήθηκαν για να διερευνηθούν ανεξάρτητες μεταβλητές συσχετιζόμενες με την έκβαση της 28<sup>ης</sup> ημέρας. Κάθε τιμή-p μικρότερη από 0.05 θεωρείται στατιστικά σημαντικά.

Όπως προαναφέρθηκε στη μελέτη εντάχθηκαν συνολικά 74 ασθενείς. Τα δημογραφικά τους στοιχεία σε συσχέτιση με την έκβαση της 28<sup>ης</sup> ημέρας αναγράφονται στον πίνακα 2. Δύο ασθενείς απεβίωσαν πριν την 7<sup>η</sup> ημέρα, πέντε ασθενείς έλαβαν εξιτήριο πριν την 7<sup>η</sup> ημέρα και τέσσερις ασθενείς αρνήθηκαν την αιμοληψία κατά την 7<sup>η</sup> ημέρα, τελικά μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε 63 ασθενείς.

Φάνηκε ότι οι επιζώντες είχαν σημαντικά υψηλότερες τιμές υδροθείου στον ορό τόσο την 1<sup>η</sup> ημέρα όσο και την 7<sup>η</sup> συγκριτικά με όσους ασθενείς κατέληξαν (Σχήμα 1, 2).

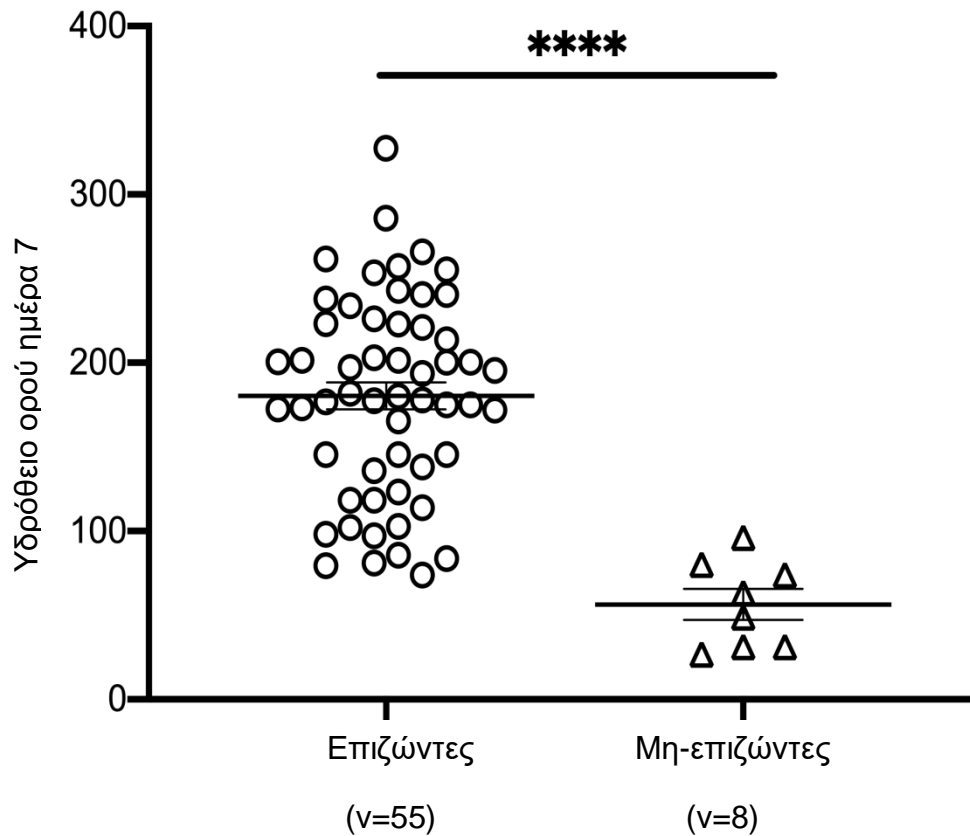


Επίπεδα υδροθείου ορού την 1<sup>η</sup> ημέρα από την εισαγωγή στο νοσοκομείο. Σύγκριση με δοκιμασία Mann Whitney \*\*  $p < 0.01$ .

Ως σημείο αναφοράς η τιμή συγκέντρωσης υδροθείου ορού 150.44  $\mu\text{M}$  είναι δυνατό να διαχωρίσει του επιζώντες από του μη-επιζώντες με 80% ευαισθησία και 73.4% ειδικότητα καθώς και 95.9% αρνητική προγνωστική αξία.



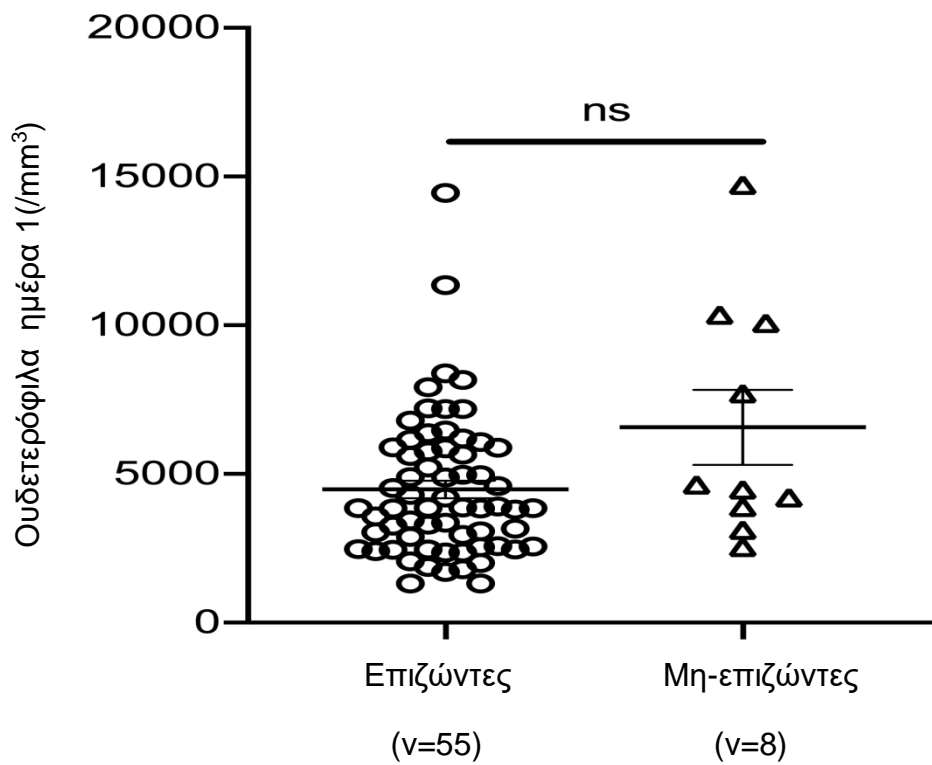
2.



Επίπεδα υδροθείου ορού την 7<sup>η</sup> ημέρα από την εισαγωγή στο νοσοκομείο. Σύγκριση με δοκιμασία Mann Whitney \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

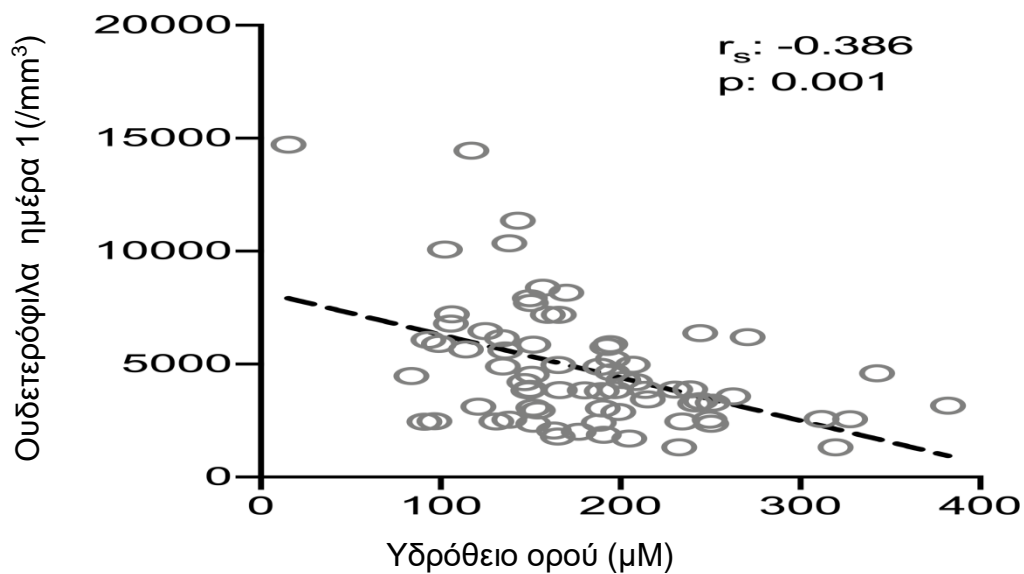
Οι μη-επιζώντες είχαν υψηλότερο απόλυτο αριθμό ουδετεροφίλων και σημαντικά χαμηλότερο λεμφοκυττάρων, γεγονότα τα οποία έχουν ήδη καταταγεί στα χαρακτηριστικά των ασθενών οι οποίοι νοσούν από COVID-19. Το υδρόθειο ορού συσχετίστηκε αρνητικά με τον απόλυτο αριθμό ουδετεροφίλων, ενώ κατεγράφη θετική συσχέτιση με τον απόλυτο αριθμό λεμφοκυττάρων. (Σχήμα 3-10)

3.



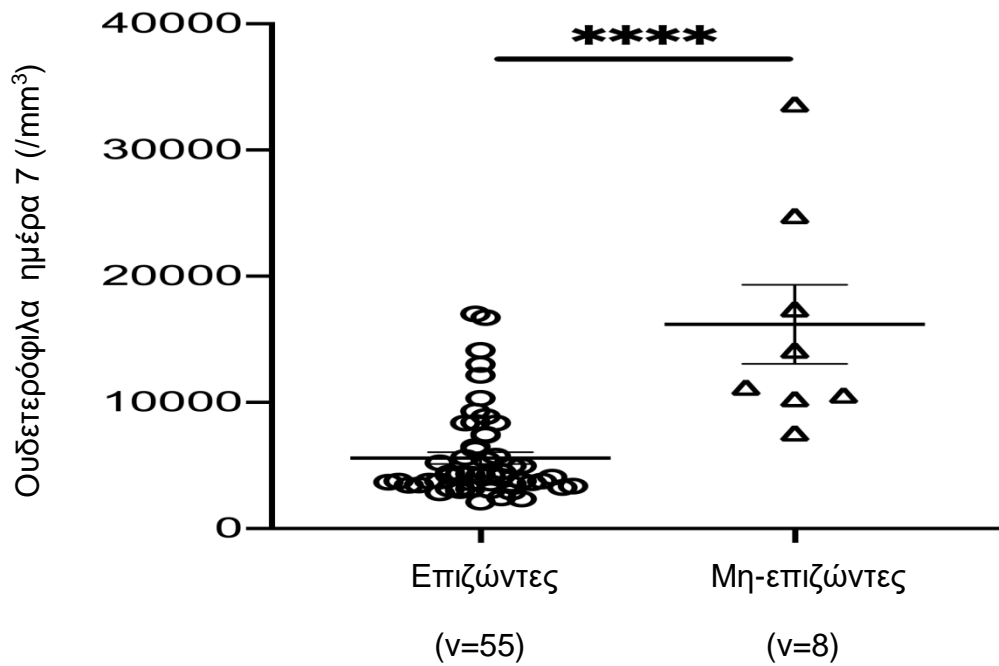
Απόλυτος αριθμός ουδετεροφίλων σε επιζώντες και μη-επιζώντες την 1<sup>η</sup> ημέρα. Η σύγκριση έγινε με δοκιμασία Mann Whitney ; ns: non-significant

4.



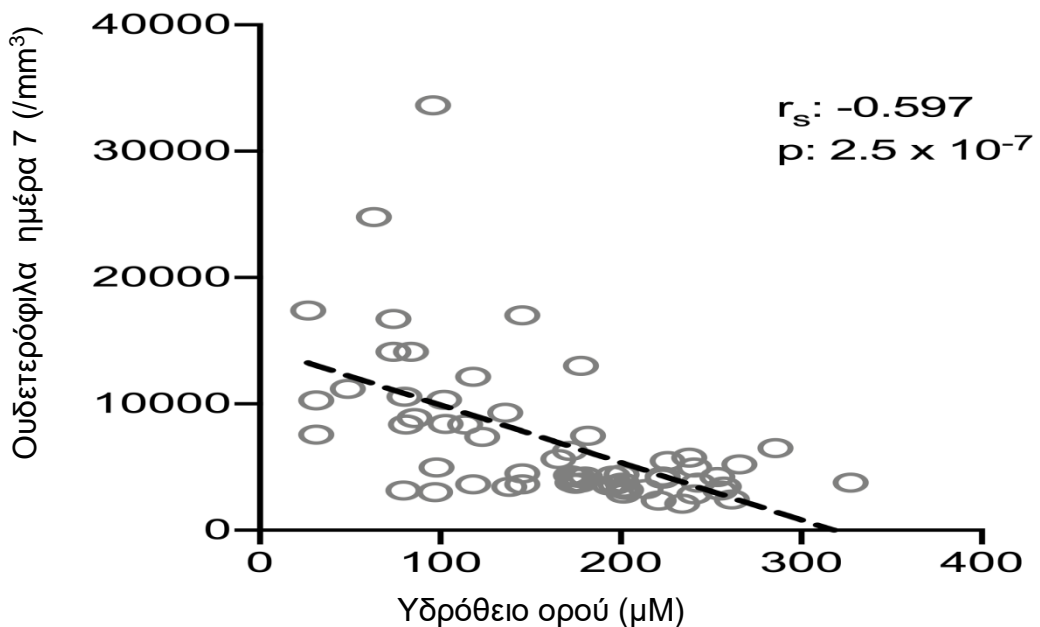
Αρνητική συσχέτιση μεταξύ απόλυτου αριθμού ουδετεροφίλων και υδροθείου ορού 1<sup>ης</sup> ημέρας. Αναγράφονται Spearman rank συντελεστής συσχέτισης ( $r_s$ ), γραμμές παρεμβολών και τιμή-p.

5.



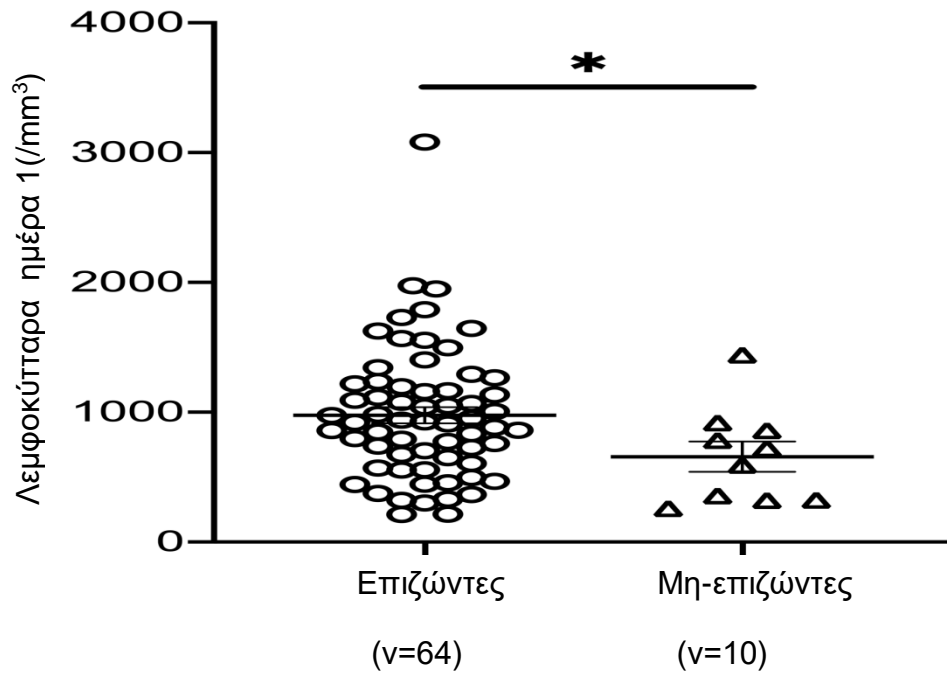
Απόλυτος αριθμός ουδετεροφίλων σε επιζώντες και μη-επιζώντες την 7<sup>η</sup> ημέρα. Η σύγκριση έγινε με δοκιμασία Mann Whitney; \*\*\*\*:  $p < 0.0001$

6.



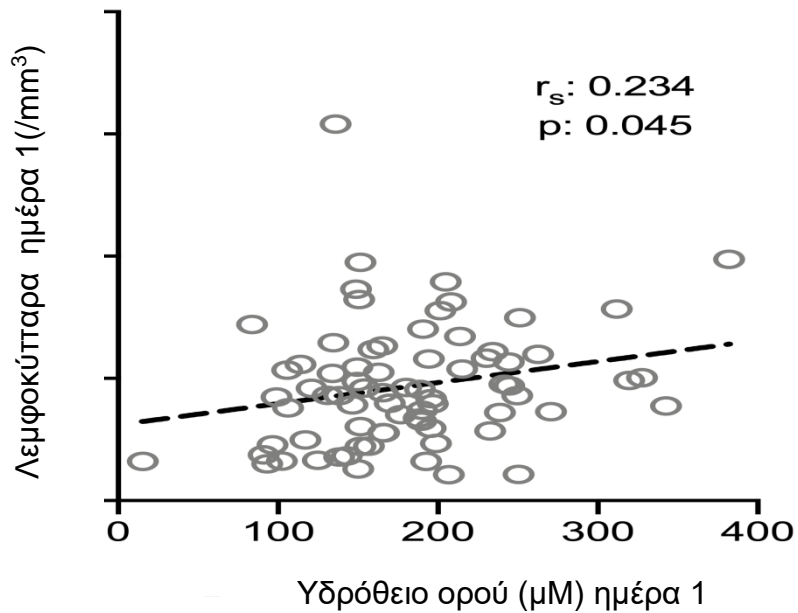
Αρνητική συσχέτιση μεταξύ απόλυτου αριθμού ουδετεροφίλων και υδροθείου ορού 1<sup>ης</sup> ημέρας. Αναγράφονται Spearman rank συντελεστής συσχέτισης ( $r_s$ ), γραμμές παρεμβολών και τιμή-p.

7.

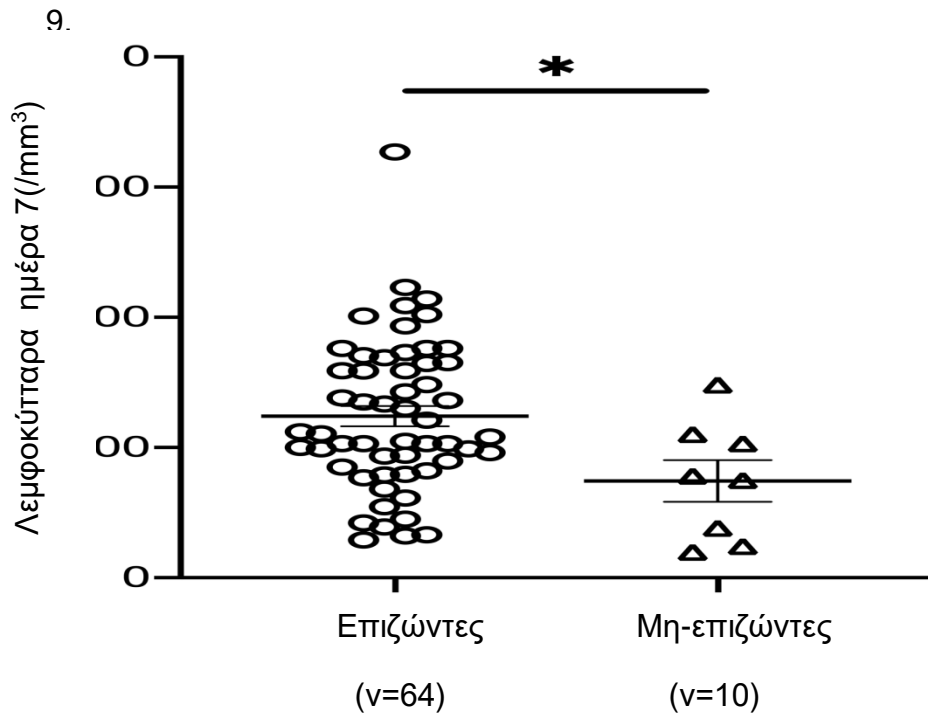


Απόλυτος αριθμός λεμφοκυττάρων σε επιζώντες και μη-επιζώντες την 1<sup>η</sup> ημέρα. Η σύγκριση έγινε με δοκιμασία Mann Whitney; \*:  $p < 0.05$

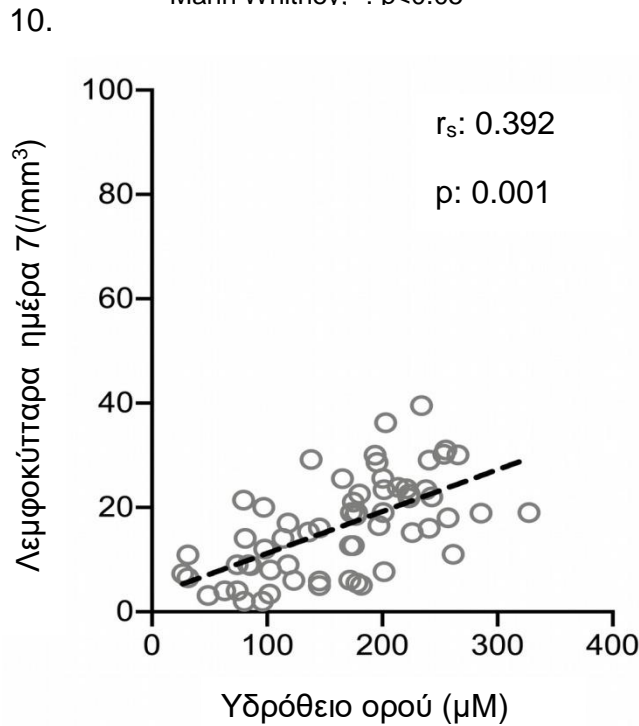
8.



Θετική συσχέτιση μεταξύ απόλυτου αριθμού λεμφοκυττάρων και υδροθείου ορού 1<sup>ης</sup> ημέρας. Αναγράφονται Spearman rank συντελεστής συσχέτισης ( $r_s$ ), γραμμές παρεμβολών και τιμή- $p$ .



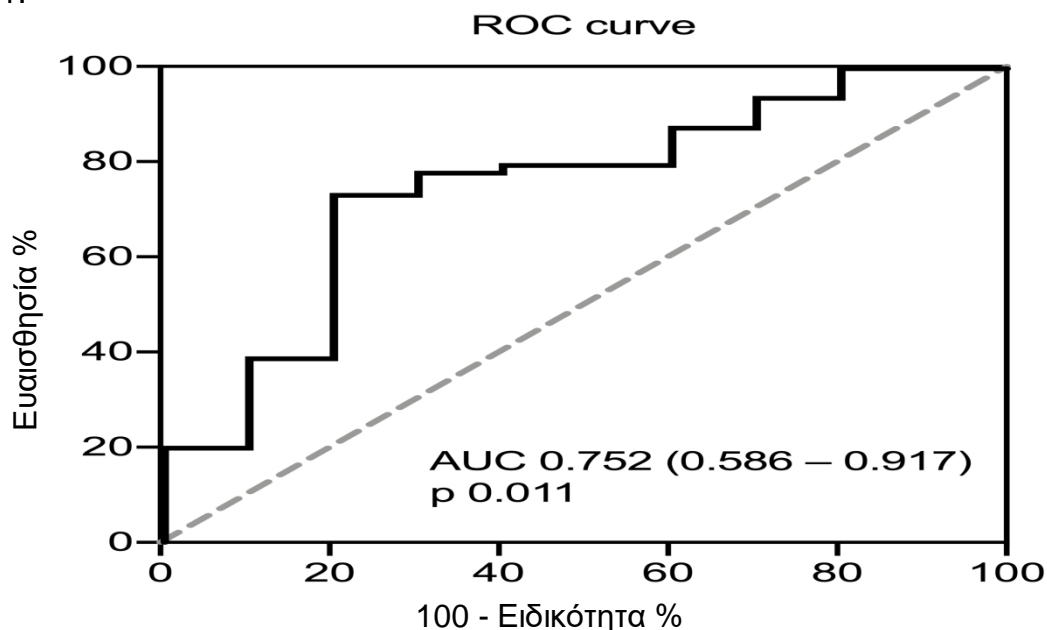
Απόλυτος αριθμός λεμφοκυττάρων σε επιζώντες και μη-επιζώντες την 7<sup>η</sup> ημέρα. Η σύγκριση έγινε με δοκιμασία Mann Whitney: \*:  $p < 0.05$



Θετική συσχέτιση μεταξύ απόλυτου αριθμού λεμφοκυττάρων και υδροθείου ορού 1<sup>ης</sup> ημέρας. Αναγράφονται Spearman rank συντελεστής συσχέτισης ( $r_s$ ), γραμμές παρεμβολών και τιμή- $p$ .

Ακολουθώντας ανάλυση ROC curve αποδείχτηκε ότι επίπεδα υδροθείου στον ορό μικρότερα των 150,44μM κατά την 1<sup>η</sup> ημέρα αποτελεί την πιο ευαίσθητη και ειδική ένδειξη επικείμενου θανάτου (σχήμα 11, 12).

11.



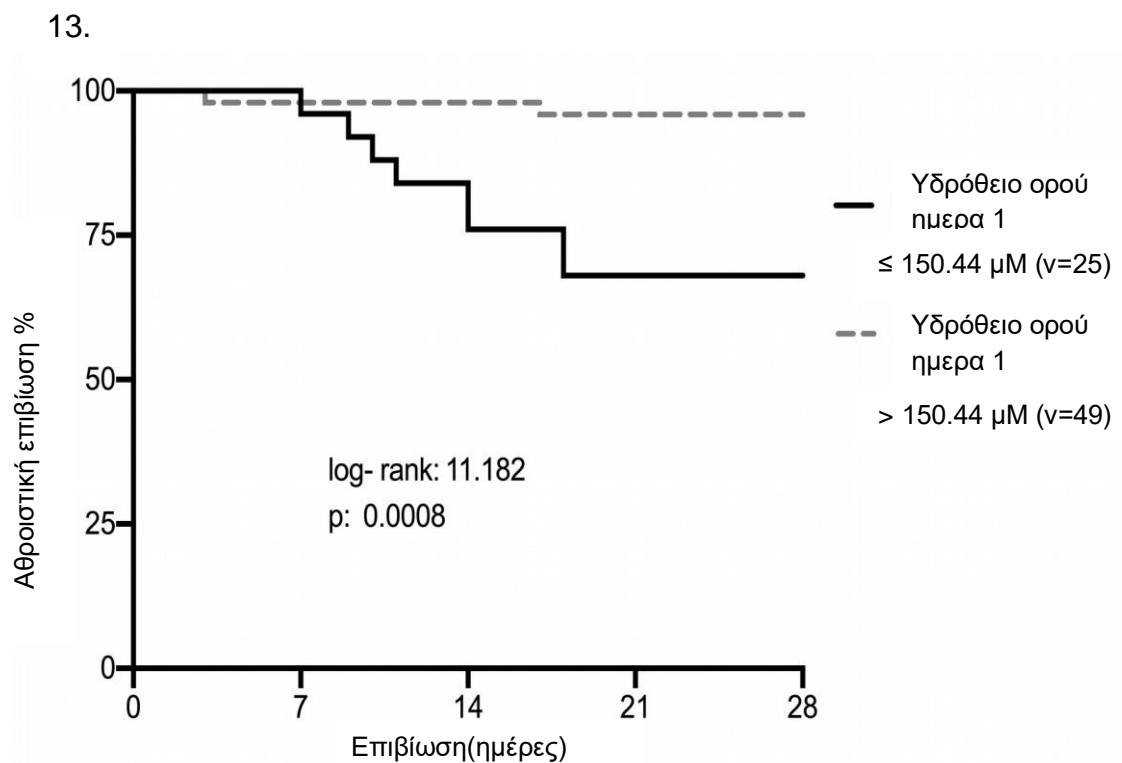
Καμπύλη ROC υδροθείου ορού ημέρας 1 για την επιβίωση 28 ημερών από πνευμονία από SARS-CoV2. Δίνονται η περιοχή κάτω από την καμπύλη(AUC), 95% διάστημα εμπιστοσύνης(CIs) και τιμή- p

12.

|  | Θάνατος<br>(n ασθενών)                                | Επιβίωση<br>(n ασθενών)  | Σύνολο |
|--|---|--|--------|
| H <sub>2</sub> S ορού<br>ημέρα 1<br>≤ 150.44μM | 8<br>Ευαισθησία:80%<br>Θετική προγνωστική<br>αξία:32% | 17   | 25     |
| H <sub>2</sub> S ορού<br>ημέρα 1<br>> 150.44μM | 2   | 47<br>Ειδικότητα:<br>73,4%<br>Αρνητική<br>προγνωστική<br>αξία: 95,9% | 49     |
|  | 10  | 64   | 74     |

Η ευαισθησία, η ειδικότητα, η θετική προγνωστική αξία και η αρνητική προγνωστική αξία του υδροθείου ορού κατά την 1<sup>η</sup> ημέρα για την θνητότητα στις 28 ημέρες

Συνολικά 49 ασθενείς είχαν συγκέντρωση υδροθείου ορού χαμηλότερη ή ίση των 150,44μM ενώ 25 ασθενείς είχαν μεγαλύτερη των 150,44μM κατά την 1<sup>η</sup> ημέρα. Η θνητότητα στις 28 ημέρες ήταν 32% και 4,1% αντίστοιχα (σχήμα 13). Ο λόγος απόδοσης(Odds Ratio) για τον θάνατο ήταν 11,11( 95% CI:2,13-5,88 p:0,001).



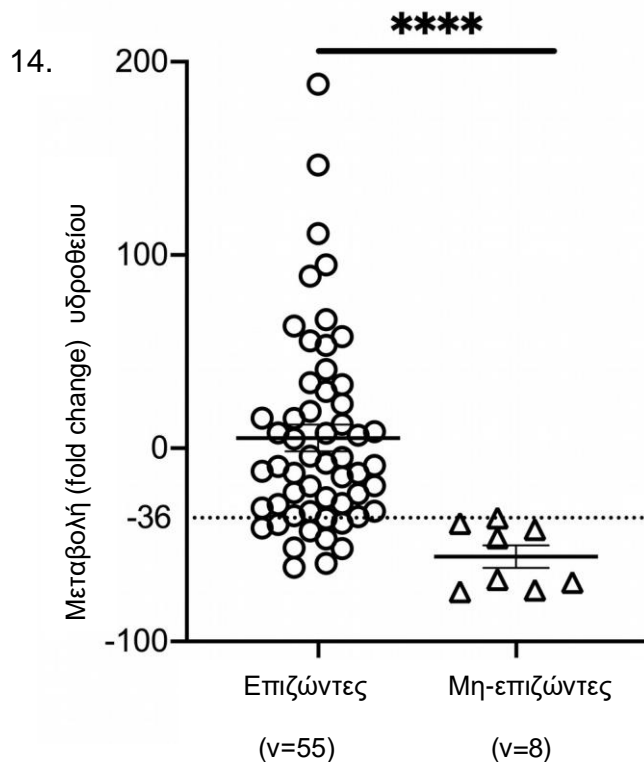
Καπλαν- Meier καμπύλη επιβίωσης στις 28 ημέρες σε σχέση με τα επίπεδα υδροθείου στον ορό των ασθενών κατά την εισαγωγή του . Αναγράφονται η τιμή-p και log-rank

Μετά από ανάλυση των αποτελεσμάτων με Cox regression παρατηρήθηκε ότι τιμή υδροθείου ορού μεγαλύτερη των 150,44μM κατά την 1<sup>η</sup> ημέρα αποτελεί ανεξάρτητο προστατευτικό παράγοντα ως προς την αποφυγή ανεπιθύμητης έκβασης από τη νόσο Covid-19, ακόμα και επί παρουσίας υψηλών βαθμολογιών στα αντίστοιχα βαθμονομικά συστήματα(Πίνακας 2) – Μέσω της ROC curve ανάλυσης συσχετίστηκαν με μη επιθυμητή έκβαση τα ακόλουθα: δείκτης συννοσηροτήτων κατά Charlsons μεγαλύτερος ή ίσος του 3, APACHE II μεγαλύτερο ή ίσο του 10, δείκτης βαρύτητας πνευμονίας μεγαλύτερος ή ίσος του 113 και SOFA score μεγαλύτερο ή ίσο του 4.

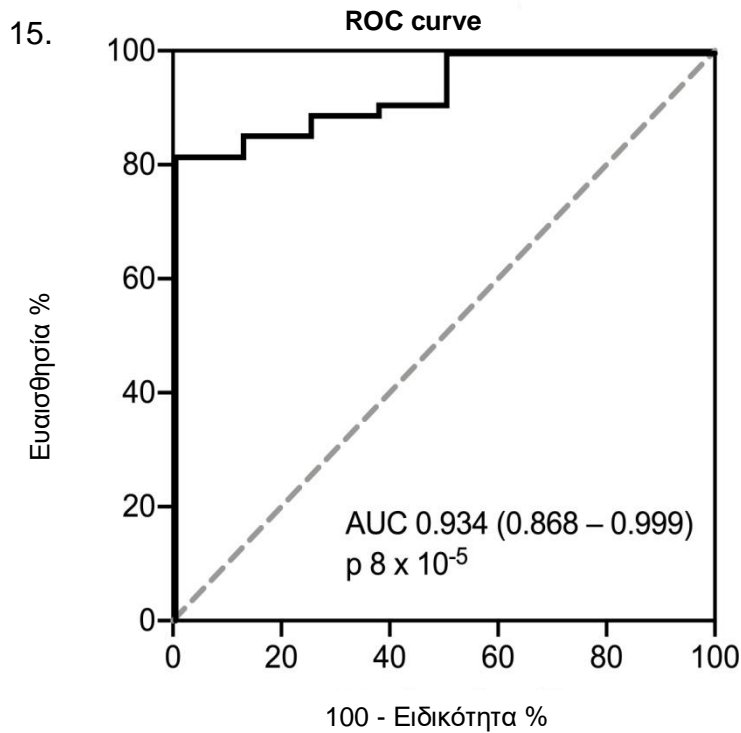
Επιπλέον μελετήσαμε την συσχέτιση της μεταβολής του υδροθείου ορού στο χρόνο και την έκβαση του ασθενούς. Η ανάλυση ROC ανέδειξε ότι μείωση κατά 36% του υδροθείου έως την ημέρα 7 είναι η βεβαιότερη ένδειξη επικείμενου θανάτου (Σχήμα 14, 15, 16). Επιπρόσθετα, μέσω της ROC curve ανάλυσης αποδείχτηκε ότι η αλλαγή στη συγκέντρωση του υδροθείου μεταξύ της 1<sup>ης</sup> και 7<sup>ης</sup> ημέρας συσχετίστηκε αρνητικά με τη διάρκεια νοσηλείας των ασθενών. (Σχήμα 17)

Αναφορικά με το βιοχημικό έλεγχο που πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της μελέτης, η ιντερλευκίνη-6 και η προκαλσιτονίνη κατά τις ημέρες 1 και 7 ήταν υψηλότερες ανάμεσα στους μη-επιβιώσαντες ενώ η c-αντιδρώσα πρωτεΐνη φάνηκε να είναι υψηλότερη για τους μη επιβιώσαντες μόνο κατά την 7<sup>η</sup> ημέρα. Ο παράγοντας νέκρωσης όγκου-α δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο κατηγορίες τόσο για την 1<sup>η</sup> όσο και για την 7<sup>η</sup> ημέρα, ομοίως και η c-αντιδρώσα πρωτεΐνη κατά την 1<sup>η</sup> ημέρα. Κατά την 1<sup>η</sup> ημέρα αλλά και κατά την 7<sup>η</sup> ημέρα η συσχέτιση του υδροθείου με τα επίπεδα ιντερλευκίνης-6, προκαλσιτονίνης, και C-αντιδρώσας πρωτεΐνης ήταν αρνητική ενώ η συσχέτιση με τον παράγοντα νέκρωσης όγκου-α ανευρέθη θετική.

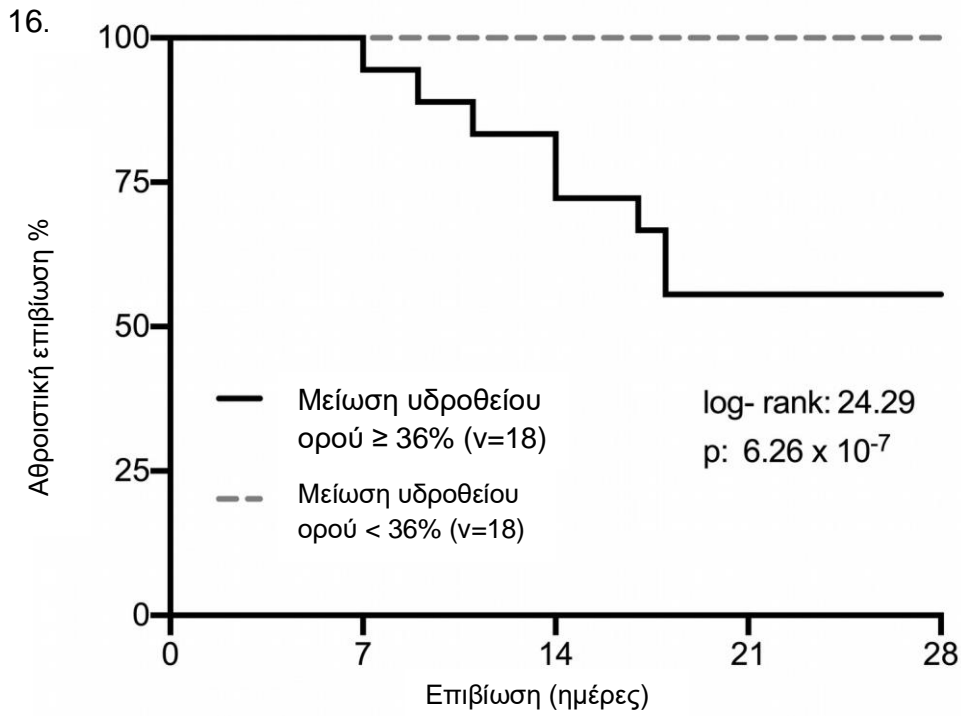




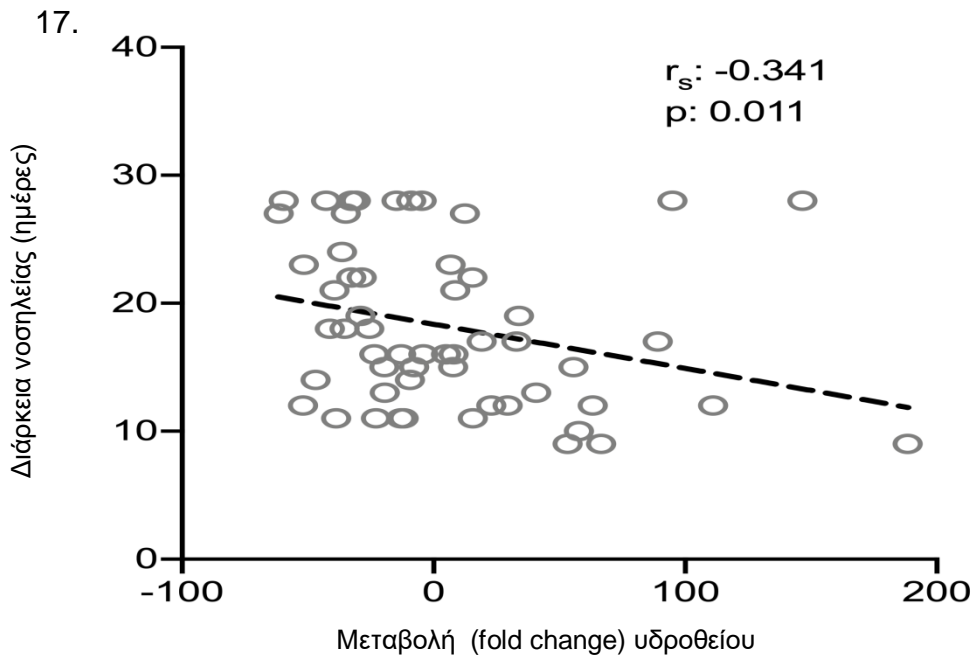
Μεταβολή του υδροθείου μεταξύ των ημερών 1 και 7 σύμφωνα με την έκβαση. Οι κύκλοι αφορούν το όριο του 36%. Χρησιμοποιήθηκε Mann Whitney U test; \*\*\*\*:  $p < 0.0001$



Καμπύλη ROC μεταβολής υδροθείου ορού στην έκβαση των 28 ημερών



Καπλαν-Μείερ καμπύλη επιβίωσης στις 28 ημέρες συσχετιζόμενη με τη μεταβολή του υδροθείου στον ορό συναρτήσει του χρόνου. Αναγράφονται τιμή- p και log-rank



Συσχέτιση μεταβολής του υδροθείου μεταξύ των ημερών νοσηλείας 1 και 7 με τη διάρκεια νοσηλείας. Αναγράφονται τιμή-p, Spearman rank συντελεστής συσχέτισης ( $r_s$ ) και γραμμές παρεμβολών.

Για τη συσχέτιση των τιμών ιντερλευκίνης-6, C-αντιδρώσας πρωτεΐνης, παράγοντα νέκρωσης όγκου-α και προκαλσιτονίνης με το υδρόθειο κατά τις ημέρες 1 και 7 χρησιμοποιήθηκε η κλίμακα συσχέτισης Spearman (συντελεστής συσχέτισης Spearman- $r_s$ , άξονες συσχέτισης, τιμές-p).

Από τη μελέτη ανευρέθη στατιστικά σημαντική διαφορά για τη μέση τιμή υδροθείου στον ορό την 1<sup>η</sup> ημέρα ανάμεσα στους επιβιώσαντες και στους μη-επιβιώσαντες με p-value <0,05, με τους επιβιώσαντες να εμφανίζουν μεγαλύτερη μέση τιμή υδροθείου ορού κατά την 1<sup>η</sup> ημέρα. Ομοίως ανευρέθη στατιστικά σημαντική διαφορά με p-value <0,0005 για τις τιμές υδροθείου στον ορό την 7<sup>η</sup> ημέρα ανάμεσα στις δύο ομάδες, με τους επιβιώσαντες να εμφανίζουν υψηλότερη μέση τιμή του υδροθείου στον ορό.

Οι τιμές ιντερλευκίνης 6 κατά την 1<sup>η</sup> και 7<sup>η</sup> ημέρα καθώς και της προκαλσιτονίνης για την 1<sup>η</sup> και 7<sup>η</sup> ημέρα ήταν υψηλότερες για τους μη-επιζώντες ενώ η τιμή της c-αντιδρώσας πρωτεΐνης ήταν υψηλότερη την 7<sup>η</sup> ημέρα για τους μη-επιζώντες, με στατιστικά σημαντικές διαφορές οι οποίες αναδεικνύονται στα αντίστοιχα σχήματα.

Τα προαναφερόμενα αποτελέσματα οδήγησαν σε επιπλέον αξιολόγηση τους υδροθείου ως έναν δείκτη επιβίωσης.

Η παρούσα μελέτη προτίνει το υδρόθειο ως πιθανό προγνωστικό δείκτη για την έκβαση των ασθενών με πνευμονία από SARS-CoV2, κυρίως λόγω της υψηλής αρνητικής προγνωστικής αξίας.(14)

Η αρνητική συσχέτιση μεταξύ του υδροθείου και της ιντερλευκίνης-6, αποτελεί ενδιαφέρον εύρημα δεδομένης της θεμελιώδους συμμετοχής της προφλεγμονώδους κυτταροκίνης στον καταρράκτη κυτταροκινών που προκαλείται κατά τη νόσο Covid-19 και οδηγεί σε σημαντική αναπνευστική βλάβη, αναπνευστική ανεπάρκεια και θάνατο.

Δεδομένων των ανωτέρω δράσεων της προφλεγμονώδους κυτταροκίνης (ιντερλευκίνη-6) έχουν προταθεί στρατηγικές για την αντιμετώπιση της νόσου Covid-19 μέσω παρεμβολής στο μονοπάτι παραγωγής της ιντερλευκίνης-6. Ένα τέτοιο προϊόν είναι η τοσιλιζουμάμπη, η οποία αποτελεί αναστολέα του υποδοχέα της ιντερλευκίνης-6 και με τον τρόπο αυτό αναστέλλει αποτελεσματικά το σηματοδοτικό μονοπάτι της ιντερλευκίνης-6. Τα αποτελέσματα της δικής μας μελέτης τεκμηριώνουν το υδρόθειο ως έναν ενδογενή αναστολέα της ιντερλευκίνης-6, η κατανάλωση του οποίου οδηγεί σε ανεπιθύμητη έκβαση της νόσου. Ταυτόχρονα, στα πλαίσια των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης

θεωρείται σκόπιμη η εξωγενής χορήγηση υδροθείου ως θεραπευτική στρατηγική στη νόσηση από Covid-19. Πράγματι, σε πειραματικό μοντέλο ποντικών, το υδρόθειο φάνηκε να μειώνει τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, μεταξύ των οποίων και την ιντερλευκίνη-6, και να αυξάνει την επιβίωση των πειραματόζων μετά από τοξιναιμία.

Συμπληρωματικά, το υδρόθειο συσχετίστηκε θετικά με τον απόλυτο αριθμό λεμφοκυττάρων. Η λεμφοπενία φαίνεται να είναι κύριο χαρακτηριστικό στη νόσο Covid-19 και αποτελεί προγνωστικό παράγοντα για τη θνητότητα. Η αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στο ενδογενές υδρόθειο και τον απόλυτο αριθμό λεμφοκυττάρων είναι δυνατό να οδηγήσει στην ανάδειξη *in vitro* του υδροθείου ως ενεργοποιητή των T-λεμφοκυττάρων.

Στην παρούσα μελέτη αποδείχθηκε ότι όλοι οι ασθενείς οι οποίοι διατηρούσαν αυξημένα επίπεδα υδροθείου μετά την 7<sup>η</sup> ημέρα δεν είχαν κίνδυνο για ανεπιθύμητη έκβαση της νόσου. Παράλληλα, από τις λοιπές βιοχημικές και αιματολογικές εργαστηριακές παραμέτρους δεν ανευρέθη στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στους επιζώντες και μη-επιζώντες από τη νόσο Covid-19 (Πίνακας 1). Με βάση τα ανωτέρω ευρήματα είναι δυνατό το υδρόθειο να χρησιμοποιηθεί μαζί με έτερους ήδη υπάρχοντες βιοδείκτες όπως η προκαλσιτονίνη και η c-αντιδρώσα πρωτεΐνη προκειμένου να ληφθούν αποφάσεις σε σχέση με τους ασθενείς. Είναι βέβαιο, ωστόσο, ότι τα δεδομένα προκύπτουν από μία μελέτη κοορτής και χρειάζεται να πραγματοποιηθούν μεγαλύτερες μελέτες κοορτών σε ασθενείς με πνευμονία Covid-19.(14)

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Gaddam R, Fraser R, Badiei A, Chambers S, Cogger VC, Le Couteur DG et al. Cystathionine-gamma-lyase gene deletion protects mice against inflammation and liver sieve injury following polymicrobial sepsis. *PLoS One*, 11(8) e0160521
2. Singh S, Lin H. Hydrogen sulfide and diseases of digestive tract. *Microorganisms* 2015, Nov 12;3(4):866-89
3. Sidhapuriwala J, Hegde A, Ang A, Zhu Y, Bhatia M. Effects of S-propargyl-cysteine (SPRC) in caerulein-induced acute pancreatitis in mice. *PLoS One* 2012;7:e32574
4. Beltowski J. Synthesis, metabolism and signaling mechanisms of hydrogen sulfide: an overview. *Methods Mol Biol* ,2019;2007:1-8
5. Castelblanco M, Lugin J, Ehrchiou D, Nasi S, Ishii I, So A et al. Hydrogen sulfide inhibits the NLRP3 inflammasome and reduces cytokine production both in vitro and in vivo in a mouse model of inflammation. *J.Biol Chem* 2018, Feb 16;293(7):2546-2557
6. XU D, Gao C, Niu W, Li Y, Wang Y, Gao C et al. Sodium hydrosulfide alleviates lung inflammation and cell apoptosis following resuscitated hemorrhagic shock in rats. *Acta Pharmacologica Sinica* (2013), 34:1515-1525
7. Dong L, Wang X, Guo Y, Wu J, Li S, Yu P et al. HS N-sulfation and iduronic acids play an important role in the infection of Respiratory Syncytial Virus in vitro. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 2013;17:1864-1868
8. Aslami H, Pulskens W, Kuipers M, Bos A, Van Kuilenburg A, Wanders R et al. Hydrogen Sulfide donor NaHS reduces organ injury in a rat model of pneumococcal pneumosepsis, associated with improved bio-energetic status. *PLoS One* May 2013;8:e63497

9. Bazhanov N, Ansar M, Ivanciuc T, Garofalo R, Casola A. Hydrogen sulfide: A novel player in airway development pathophysiology of respiratory diseases and antiviral defenses. *Am J Respir Cell Moll Biol.* 2017, Oct; 57(4):403-410
10. Faller S, Hausler F, Goeft A, von Itter M, Gyllenram V, Hoetzel A et al. Hydrogen sulfide limits neutrophil transmigraton, inflammation, and oxidative burst in lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Sci Rep.* 2018; 8:14676
11. Ivanciuc T, Sbrana E, Ansar M, Bazhanov N, Szabo C, Casola A et al. Hydrogen sulfide: An antiviral and anti-inflammatory endogenous gasotransmitter in the airways. Role in respiratory syncytial virus infection. *Am J Respir Cell Moll Biol.* 2016 Nov;55(5):684-696
12. Faller S, Seiler, Donus R, Engelstaedter H, Hoetzel A, Spassov S. Pre- and posttreatment with hydrogen sulfide prevents ventilator-induced lung injury by limiting inflammation and oxidation. *PLoS One* April 2017;12(4):e0176649
13. Bazhanov N, Escaffre O, Freiberg A, Garofalo R, Casola A. Broad-Range antiviral activity of hydrogen sulfide against highly pathogenic RNA-viruses. *Scient. Rep* Jan 2017; 41029(7)
14. Renieris G, Katrini K, Damoulari C, Akinosoglou K, Psarrakis C, Kyriakopoulou M et al. Serum hydrogen sulfide and outcome association in Pneumonia by the SARS-CoV-2 Coronavirus. *Shock.*2020 Nov;54(5):633-637